

**I. Konformationsanalyse von
5, 6, 7, 8-Tetrahydropteroinsäure
und 5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-folsäure**

**II. Diastereomerentrennung von
5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-neopterin
und 5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-biopterin**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung
der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von
HANS-JÜRG FURRER
von Zürich (ZH)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. M. Viscontini

1980



Juris Druck + Verlag Zürich
1979

**I. Konformationsanalyse von
5, 6, 7, 8-Tetrahydropteroinsäure
und 5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-folsäure**

**II. Diastereomerentrennung von
5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-neopterin
und 5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-biopterin**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung
der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von

HANS-JÜRG FURRER
von Zürich (ZH)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. M. Viscontini



Juris Druck + Verlag Zürich
1979



ISBN 3 260 0474 3

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. M. Viscontini,

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, danke ich herzlich für das grosse Interesse und die zahlreichen wertvollen Anregungen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn, Herrn Dr. W. Schwotzer und Herrn E. Vonbank für die Aufnahme der NMR.-Spektren sowie für ihre Hilfe bei deren Interpretation, Herrn Prof. Dr. M. Hesse, Herrn N. Bild und Frau Dr. Lorenzi für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn H. Frohofer, Leiter der mikroanalytischen Abteilung, und seinen Laborantinnen für die Elementaranalysen.

Herrn E. Khalifa, mit dem ich jahrelang im selben Labor zusammenarbeitete, danke ich für viele wertvolle Diskussionen und eine gute Freundschaft.

Speziell bedanken möchte ich mich bei unserem Oberassistenten Herrn Dr. J.H. Bieri, der mit seinen Ideen, Anregungen und Gesprächen grossen Anteil am Gelingen dieser Doktorarbeit trägt.

Inhaltsverzeichnis

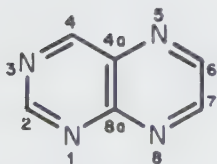
	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	11
2. <u>I. Teil</u>	17
A. <u>Allgemeiner Teil</u>	17
Bedeutung und Konformationsaufklärung der Tetrahydrofolsäure	
B. <u>Theoretischer Teil zu den eigenen Arbeiten</u>	21
1. Synthese von Pteroinsäuremodellen	21
2. Deuteriumeinbau in 5,6,7,8-Tetrahydro- pteroinsäure (6,9-Dideuterio-5,6,7,8- tetrahydropteroinsäure)	23
3. Konformationsanalyse von 5,6,7,8-Tetra- hydropteroinsäure	27
4. Konformationsanalyse von 5,6,7,8-Tetra- hydrofolsäure	35
C. <u>Experimenteller Teil</u>	38
D. <u>Zusammenfassung</u>	51

	Seite
3. <u>II. Teil</u>	53
A. <u>Allgemeiner Teil</u>	53
1. Pterine mit Polyhydroxy-Seitenketten	53
1.1. Vorkommen von L-Biopterin	54
1.2. Vorkommen von D-Neopterin	55
2. Physiologische Bedeutung von Biopterin	55
3. Biogenese von Biopterin	58
B. <u>Theoretischer Teil zu den eigenen Arbeiten</u>	60
1. Eine allgemeine Einführung	60
2. Trennung der Diastereomeren 6R- und 6S- 5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin	62
3. Trennung der Diastereomeren 6R- und 6S- 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin	67
C. <u>Experimenteller Teil</u>	72
D. <u>Zusammenfassung</u>	82
4. Literaturverzeichnis	83

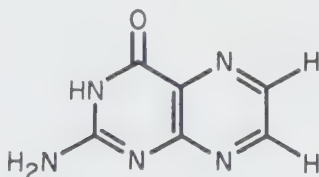
1. Einleitung und Problemstellung

Die Geschichte der Pteridinchemie beginnt mit den Untersuchungen von Gowland Hopkins [1 - 4], welchem es gelang, aus Schmetterlingsflügeln einige Farbpigmente zu isolieren. Eine systematische Bearbeitung dieser Stoffe erfolgte erst 30 Jahre später durch Wieland, Schöpf und ihre Mitarbeiter [5] [6].

Die Pigmente erhielten die Bezeichnung Pterine aus dem griechischen pteron = Flügel. Die Strukturaufklärung dieser Stoffklasse liess weitere 25 Jahre auf sich warten und erwies sich als ausserordentlich schwierig. Geling es doch erst 1940 Purrmann [7] [8] zu beweisen, dass es sich bei den Flügelpigmenten um ein heterobizyklisches System handelt, dem Wieland 1941 den Trivialnamen Pteridin (1) [9] gab.



I



II

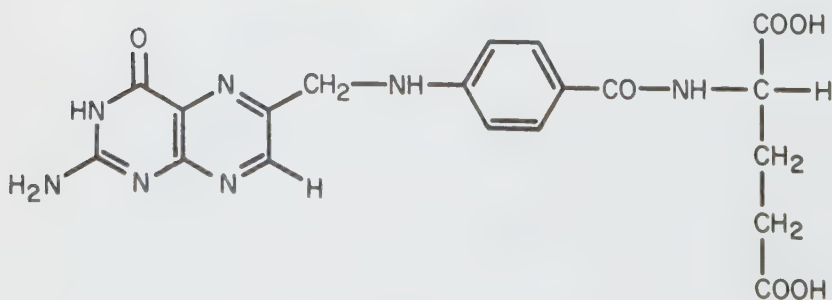
Alle bekannten natürlichen Pteridine sind 2-Amino-4-hydroxy-Derivate (II), die am C(6) bzw. C(7) substituiert sein können. Viscontini [10] schlug deshalb vor, den Namen Pterin (II) auf diese Substanzklasse zu be-

schränken. Dieser Trivialname ist geeignet, da das Pterin selbst, ohne Seitenkette am C(6) bzw. C(7) häufig in der Natur vorkommt [11] [12].

Pfleiderer [13] bewies experimentell, dass das Pterin (II) im physiologischen pH-Bereich in der energetisch begünstigteren Laktamform vorliegt, dem 2-Amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin (II). Quantenchemische Berechnungen zeigten dabei, dass die Amidresonanz des Pterins um 8 - 10 kcal/Mol stabilisiert ist.

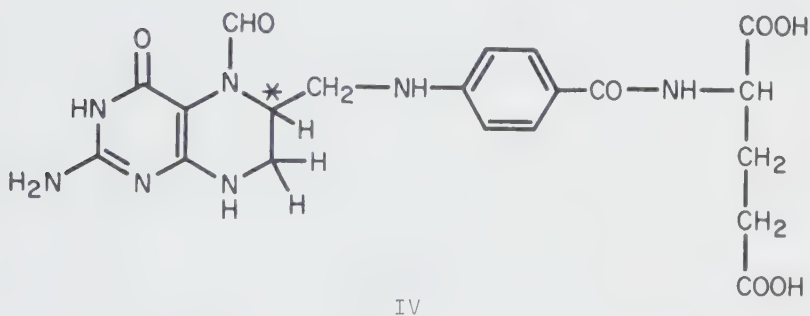
In den Jahren 1931 bis 1941 wurden eine Reihe weiterer Verbindungen vor allem aus Leber, Hefe und Spinat isoliert, bei denen es sich um Wachstumsfaktoren sowohl für Tiere als auch für Mikroorganismen handelt. Zudem zeigten die gewonnenen Extrakte eine gewisse anti-anämische Wirkung bei höheren Tieren und dem Menschen.

1946 gelang Angier und Stokstad [14] die Struktur einer von Mitchell [15] aus Spinatblättern isolierten Substanz, aufzuklären. Es handelte sich dabei um die Pteroyl-glutaminsäure (III) oder auch Folsäure genannt, aufgrund ihrer grossen Verbreitung in grünen Blättern (lat. = folium, Blatt).



III

Es wird heute allgemein angenommen, dass nur diejenigen substituierten Pterine Coenzym-Eigenschaften zeigen, bei denen der Pyrazinring reduziert ist. Aus der Leber konnte das erste im Pyrazinring vollständig hydrierte Folsäurederivat isoliert werden [16 - 19]. Es handelte sich dabei um N(5)-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (IV) (Abkürzung: N(5)-Formyl-FH₄). Dieses Coenzym wurde, wegen der starken wachstumsfördernden Wirkung auf das Bakterium *Leuconostoc citrovorum* [18], Citrovorumfaktor (IV) genannt. (In der Literatur werden auch die Namen Leucovorin und seltener Folinsäure verwendet).



Viscontini war bereits früh von der wichtigen biologischen Bedeutung der hydrierten Pterine überzeugt. Er fing deshalb zusammen mit Weilenmann an, das Pterin am Pyrazin-kern zu hydrieren und die chemischen Eigenschaften des

Die physiologische Wirksamkeit und die Erkenntnis, dass vor allem die tetrahydrierten, in C(6)-Stellung substituierten Pterine eine Schlüsselstellung im biochemischen Metabolismus einnehmen, machte diesen Zweig der Chemie zu einem Gebiet zentraler Forschung.

Die vorliegende Arbeit soll nun einen Beitrag zu diesen Problemen liefern. Im Mittelpunkt des ersten Teils steht die Frage der Konformation von tetrahydrierten Pterinen. Im zweiten Teil werden Diastereomere auf chemischem Wege getrennt, welche sich durch die Hydrierung der C(6)-Stellung von bestimmten Pterinen ausbilden.

Erster Teil

Konformationsanalysen von 5,6,7,8-Tetrahydropteroin-
säure und 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure

A. Allgemeiner Teil

Bedeutung und Konformationsaufklärung der Tetrahydrofolsäure

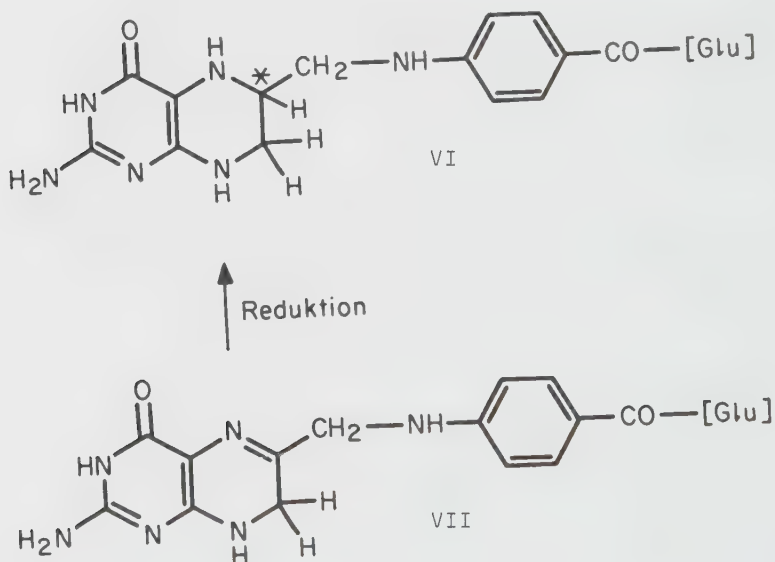
Die im Pyrazinring hydrierten Pterinderivate spielen als Coenzym eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen. Besonders die Tetrahydrofolsäure und ihre Derivate nehmen im biochemischen Metabolismus eine Schlüsselstellung ein, dieser Zweig der Pterinchemie wurde und wird deshalb intensiv bearbeitet.

Die wichtigsten biochemischen Umwandlungen der Tetrahydrofolsäure (VI) und ihrer Derivate sind von Stokstad und Koch [31], sowie von Blakley [32] erkannt worden. Die Reaktionen laufen mehrheitlich im Zellplasma ab. Einige Enzyme, so z. B. die Serin-Transhydroxymethylase, sammeln sich in den Organellen an. Die Reduktion von Folsäure (III) zu Dihydrofolsäure (VII) und weiter zu Tetrahydrofolsäure (VI) erfolgt ebenfalls enzymatisch. Das Enzym, welches in Gegenwart des wasserstoffübertragenden Coenzym NADPH die Reduktion von VII zu VI katalysiert, wird als Dihydrofolat-Reduktase bezeichnet.

Die im Pyrazinring hydrierten Pterine lassen sich alle sehr leicht wieder oxidieren. Dies gilt vor allem auch für die unsubstituierte Tetrahydrofolsäure (VI), die an der Luft bereits nach wenigen Minuten in eine ganze Reihe von Oxidationsprodukten übergeht. Viscontini und Mitarbeiter [33] [34] sowie Blair und Pearson [35] haben die Autooxidation von in C(6)-Stellung substituierten Tetrahydropterinen

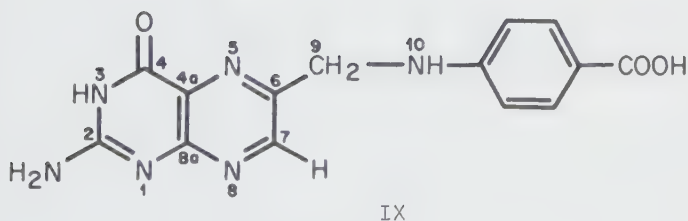
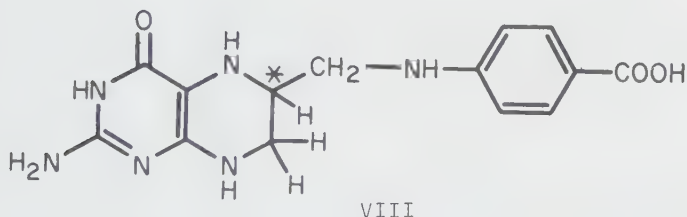
untersucht. Sie fanden bei der Oxidation von Tetrahydrofolsäure (VI) als Endprodukte u. a. Folsäure (III) und Pterin (II).

Leider ist die absolute Konfiguration der Tetrahydrofolsäure (VI) bis heute noch nicht aufgeklärt worden.



Mittels ^1H -NMR.-spektroskopischen und röntgenkristallographischen Methoden konnten die Konformationen von 6-Methyl-, 5,6-Dimethyl- [36], 6,7-Dimethyl-, 5,6,7-Tri-methyl- [37] und 5-Formyl-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin [38] abgeklärt werden.

Bereits in früheren Arbeiten wurde versucht die Konformation der Tetrahydrofolsäure (VI) mittels ^1H -NMR.-Studien aufzuklären [39] [40]. Die Untersuchungen schlugen jedoch fehl, weil die erhaltenen ^1H -NMR.-Spektren Schwierigkeiten bei der Interpretation ergaben. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde zunächst die Konformation an der Modellsubstanz Tetrahydropterinsäure (VIII) (Fig. 1) untersucht und daraufhin diejenige der Tetrahydrofolsäure (VI) selbst.



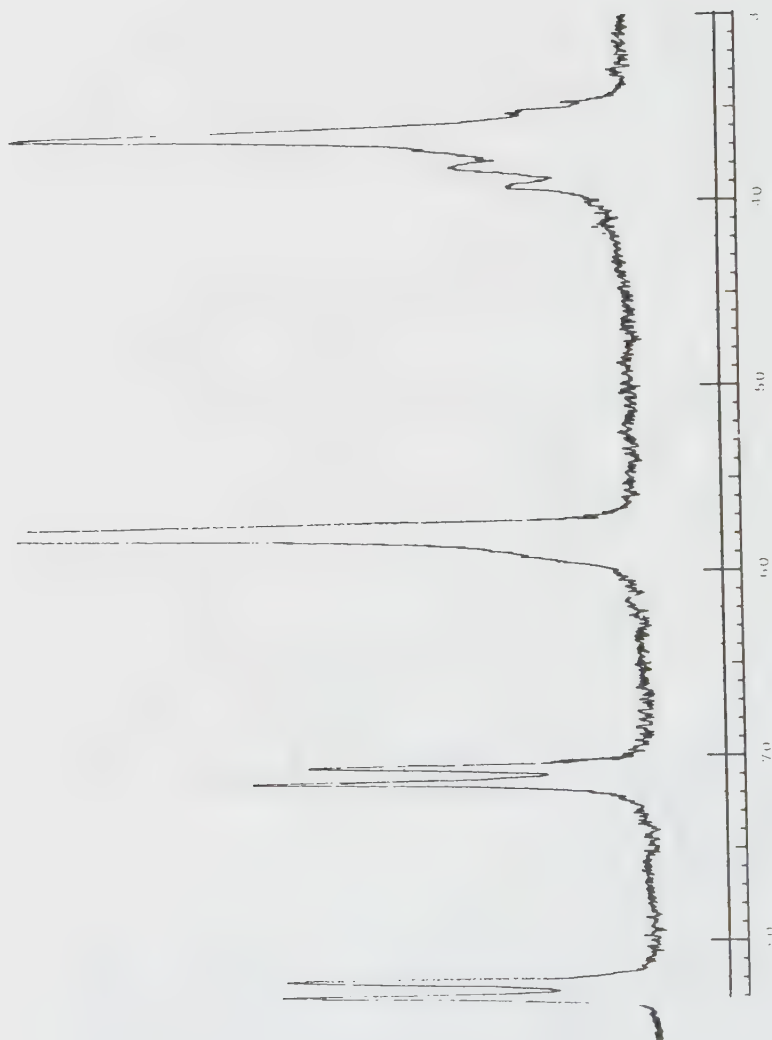


Fig. 1. ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von 5,6,7,8-Tetrahydropteroin-
säure (VIII) in 3,0N NaOD.

B. Theoretischer Teil zu den eigenen Arbeiten

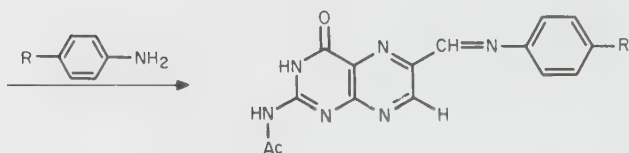
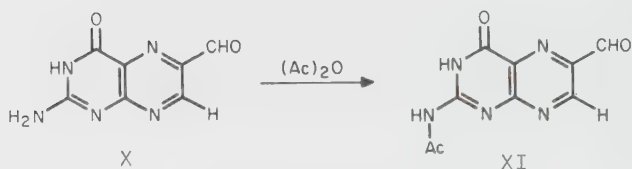
1. Synthese von Pteroinsäuremodellen

Im Hinblick auf eine vereinfachte Interpretation des ^1H -NMR.-Spektrums von 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure (VIII) (Fig. 1) zum Zwecke der Konformationsanalyse, wurde der Einfluss von verschiedenen Substituenten in para-Stellung des Aromaten auf die chemische Verschiebung der Protonen in Stellung C(9) untersucht. Dabei waren Substituenten mit negativem induktivem Effekt von besonderer Bedeutung, da eine Entschirmung der $\text{H}_2\text{-C}(9)$ -Protonen, und damit eine Verschiebung der entsprechenden Signallage nach tieferem Feld, erreicht werden sollte.

Die Kondensation von p-Chloranilin und p-Anisidin mit N(2')-Acetyl-6-formylpterin (XI) wurde in abs. Alkohol unter Modifikation der Vorschrift [41] durchgeführt, wobei die Azomethine XII und XIII gebildet wurden. Anschliessend wurden durch Reduktion der Schiff-schen Basen XII und XIII mit Natriumborhydrid die entsprechenden Amine XIV und XV dargestellt [41].

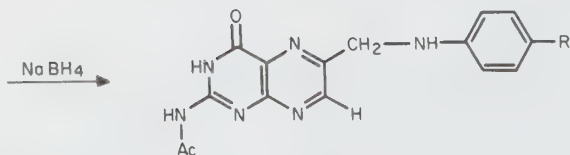
Aufgrund der erhaltenen ^1H -NMR.-Spektren von XIV und XV kann ausgesagt werden, dass die gewählten Substituenten über das mesomere System des Phenylrestes, inklusive der N(10)-Aminofunktion, sowie der Sigma-bindung C(9)-N(10) keinen signifikanten Entschirmungseffekt auf die Protonen in Stellung C(9) ausüben.

Eine weitere Möglichkeit zur Entschirmung der C(9)-Protonen wäre die Einführung einer Nitrofunktion, die neben einem negativen induktiven auch einen negativen mesomeren Effekt mit sich bringt, aber die Kondensation von p-Nitroanilin mit XI, sowohl in abs. Alkohol wie auch in der Schmelze [42], gelang nicht. Daraufhin entschlossen wir uns, die Pteroinsäure (IX) selbst als Modell-Substanz zu verwenden.



XII: R = Cl

XIII: R = OCH₃



XIV: R = Cl

XV: R = OCH₃

2. Deuteriumeinbau in 5,6,7,8-Tetrahydropterinsäure

Dass die Seitenkette im thermodynamisch günstigeren Konformer eine äquatoriale Lage einnimmt, zeigte sich gleich nach der Aufnahme der ersten ^1H -NMR.-Spektren, weil sehr ähnliche chemische Verschiebungen für die Protonen an C(7) und C(9) gemessen wurden.

Mittels Ersatz eines Wasserstoff-Atoms an C(9) durch Deuterium gelang es jedoch, die Zuordnung der Protonen in C(9) bzw. C(7)-Stellung, NMR.-spektroskopisch zu treffen.

Das N(2')-Acetyl-6-formylpterin (XI) wurde mit dem Anilinderivat XVI nach [41] und [42] kondensiert.

Das N(2')-Acetyl-6-[N-(p-methoxycarbonyl-phenyl)-iminomethyl]-pterin (XVII) wurde mit Natriumbordeuterid behandelt. Dies lieferte XVIII, welches in C(9)-Stellung ein Deuteriumatom trägt. Alkalische Verseifung und anschliessende Dithionitreduktion lieferte das 7,8-Dihydroderivat (XX) (Fig. 2) der Pterinsäure (IX). Nochmalige Natriumbordeuteridreduktion lieferte das in C(6)-Stellung deuterierte, sowie in C(9)-Stellung zu 50 % deuterierte Tetrahydropterinsäurederivat (XXI) (Fig. 3). NMR.-spektroskopisch können die Resonanzen der Protonen in C(9)-Stellung und in C(7)-Stellung beim Dihydro- (XX) (Fig. 2) und Tetrahydroderivat (XXI) (Fig. 3) von Pterinsäure (IX) in ihren chemischen Verschiebungen unterschieden werden.



Fig. 2. ^1H -NMR.-Spektrum (60 MHz) von 7,8-Dihydro-9-deuterio-
pteroinsäure (XX) in 1,0N NaOD.
Die Stellung C(9) ist zu 50 % deuteriert.

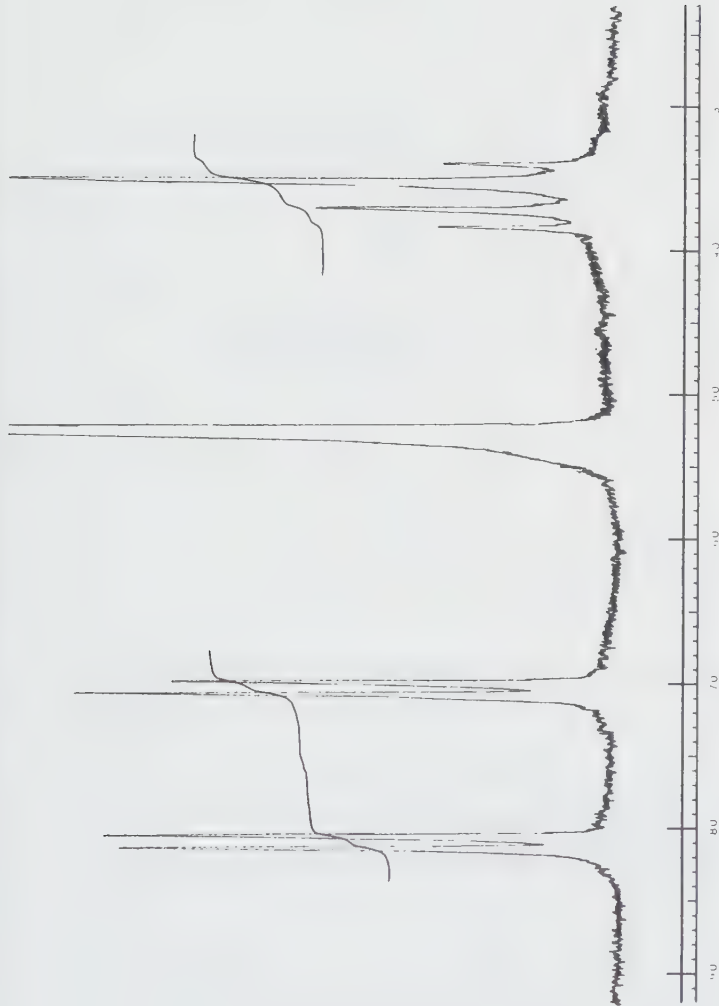
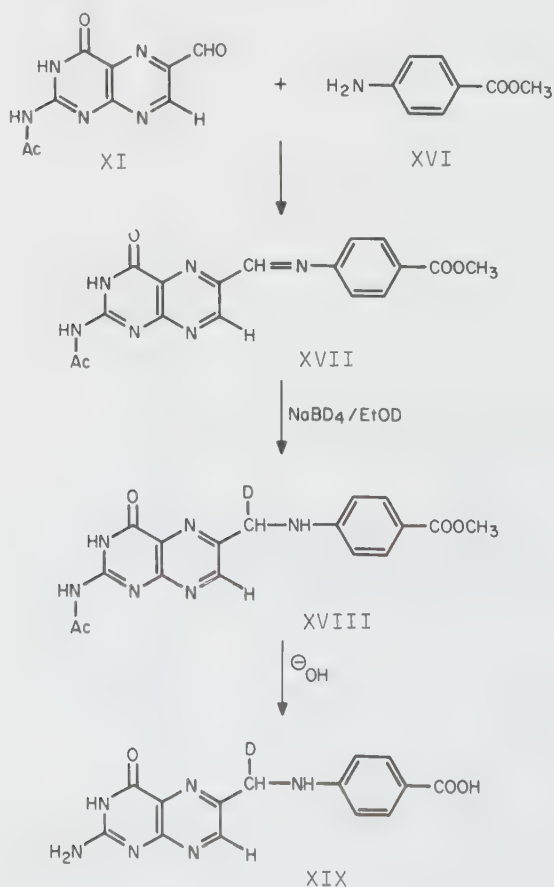
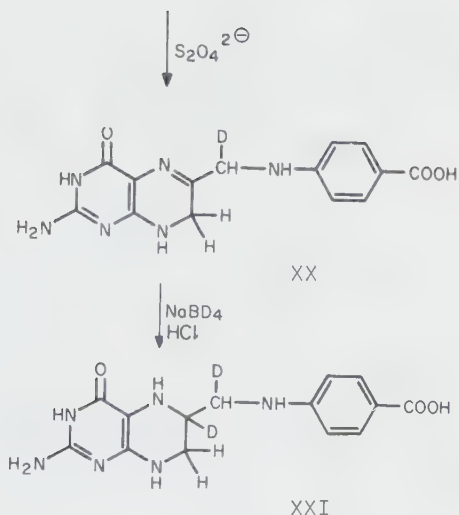


Fig. 3. ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von 6,9-Dideuterio-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure (XXI) in 1,0N NaOD. Die Stellung C(9) ist zu 50 % deuteriert.

Aus dem Vergleich der Protonenspektren von racemischer 5,6,7,8-Tetrahydropterinsäure (VIII) [43] (Fig. 1) mit dem Gemisch der diastereomeren 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (VI) [44] geht hervor, dass die ^1H -Resonanzfrequenzen beider Substanzen im Bereich der C(7)- und C(9)-Protonen identisch sind.

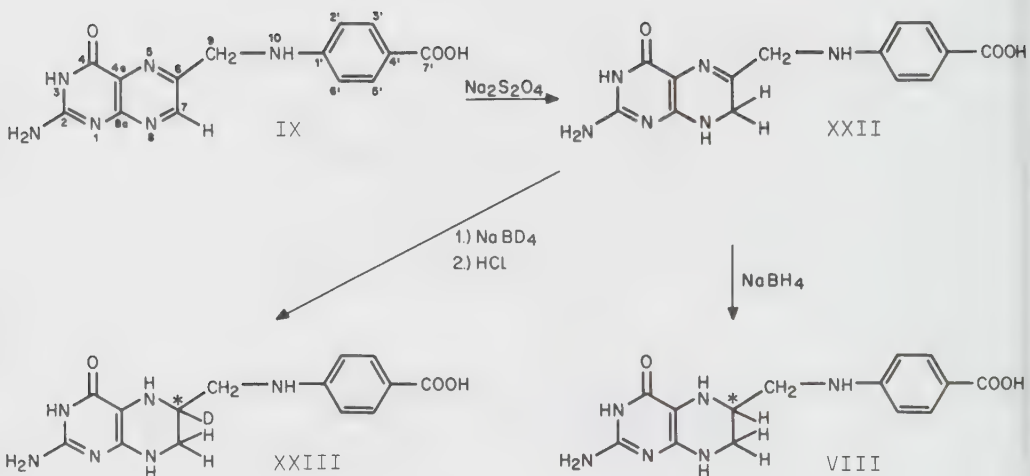
Damit kann angenommen werden, dass Tetrahydropterinsäure (VIII) als gutes Modell für Tetrahydrofolsäure (VI) betrachtet werden kann.





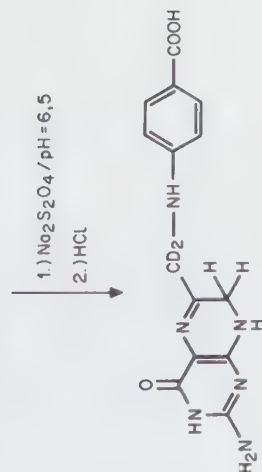
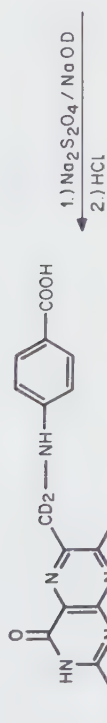
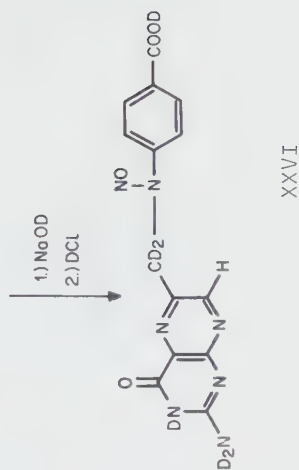
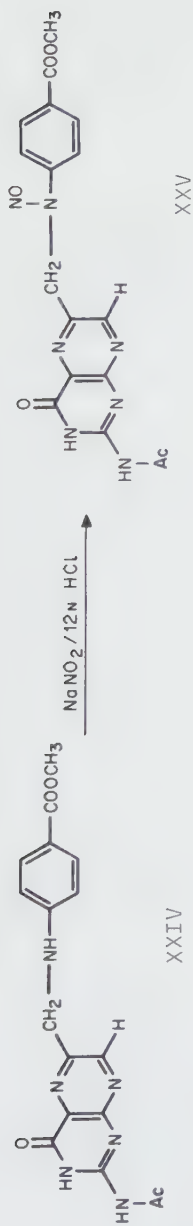
3. Konformationsanalyse von 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure

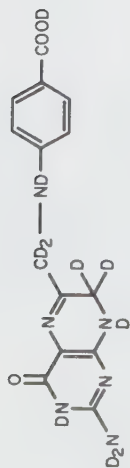
Bei der Synthese von 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure (VIII), sowie den zu ihrer Konformationsanalyse benötigten deuterierten Verbindungen XXX, XXXI und XXXII wurde von Pteroinsäure (IX) ausgegangen. Die Reduktion mit Natriumdithionit [45] führte zum Dihydroderivat (XXII). Anschliessende Weiterreduktion entweder mit Natriumborhydrid [46] [47], oder mit Natriumbordeuterid führte zur 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure (VIII) bzw. 6-Deuterio-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure (XXIII).



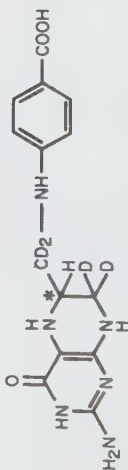
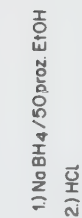
Um aber eine regiospezifische Deuterierung der C(9)-Stellung zu erreichen, ist der Einbau einer Nitroso-Gruppe in N(10)-Stellung der zentrale Schritt.

Ausgegangen wurde dabei von XXIV [41]. Die Nitrosierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Cosulich und Smith [48] und führte zum in N(10)-Stellung nitrosierten Derivat XXV. Die Wasserstoff-Atome in C(9)-Stellung werden durch die Nitrosfunktion sauer und lassen sich leicht durch Deuterium ersetzen [49]. Das in C(9)-Stellung deuterierte Derivat XXVI wurde mit Natriumdithionit [49] behandelt und führte über die 9,9-Dideuterio-pteroinsäure (XXVII) zur 9,9-Dideuterio-7,8-dihydropteroinsäure (XXVIII).





XXIX



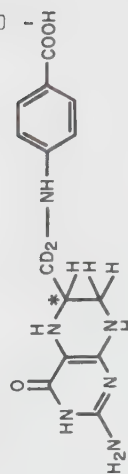
XXX



XXVIII



XXXI



XXXII

Die 9,9-Dideuterio-7,8-dihydropteroinsäure (XXVIII) führt durch Weiterreduktion zu den für die Konformationsanalyse benötigten deuterierten Substanzen XXX, XXXI und XXXII.

Aus dem ^1H -NMR.-Spektrum von XXX (Fig. 4) kann die chemische Verschiebung von $\text{H-C}(6)$ herausgelesen werden (3,70 ppm). Das AB-System der $\text{C}(7)$ -Protonen von XXXI mit δ -Werten von 3,83 und 3,53 ppm sowie $|J| = 12 \text{ Hz}$ ist aus Figur 5 ersichtlich. Das ABX-System der Tetrahydropyrazinringprotonen von XXXII zeigt Figur 6.

Da zur Konformationsanalyse von Tetrahydropteroinsäure (VIII) ein eindeutig interpretierbares Protonenspektrum von XXXII vorliegen muss (das Spektrum von XXXII (Fig. 6) genügt dieser Anforderung nicht), wurde das ^1H -NMR.-Spektrum von XXXII (Fig. 7) bei 360 MHz aufgenommen. Dieses zeigt ein AMX-System, aus welchem die zur Konformationsanalyse benötigten geminalen und vicinalen Kopplungskonstanten herausgelesen werden können:

$$J_{\text{AM}} = 3,2; J_{\text{AX}} = -12; J_{\text{MX}} = 6,7 \text{ Hz.}$$

Das mit den obigen Daten simulierte ^1H -NMR.-Spektrum von XXXII ist mit dem experimentellen identisch (Fig. 7).

Die vicinale Kopplungskonstante in der Verbindung XXXII von $\text{H}_a\text{-C}(6)$ und $\text{H}_a\text{-C}(7)$ beträgt 6,7 Hz und belegt deren angenähert trans-diaxiale Anordnung, diejenige von 3,2 Hz die gauche-Konformation von $\text{H}_a\text{-C}(6)$ und $\text{H}_e\text{-C}(7)$. Die relativ kleinen Kopplungskonstanten sind auf den Einfluss der Heteroatome in Stellung 5 und 8 zurückzuführen.

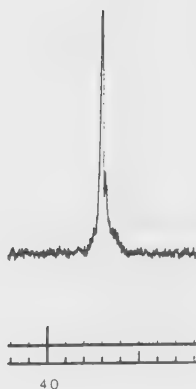


Fig. 4. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von XXX im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen in 1N NaOD.

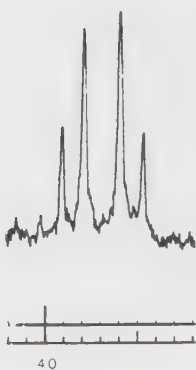


Fig. 5. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von XXXI im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen in 1N NaOD.



Fig. 6. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von XXXII im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen in 1N NaOD.

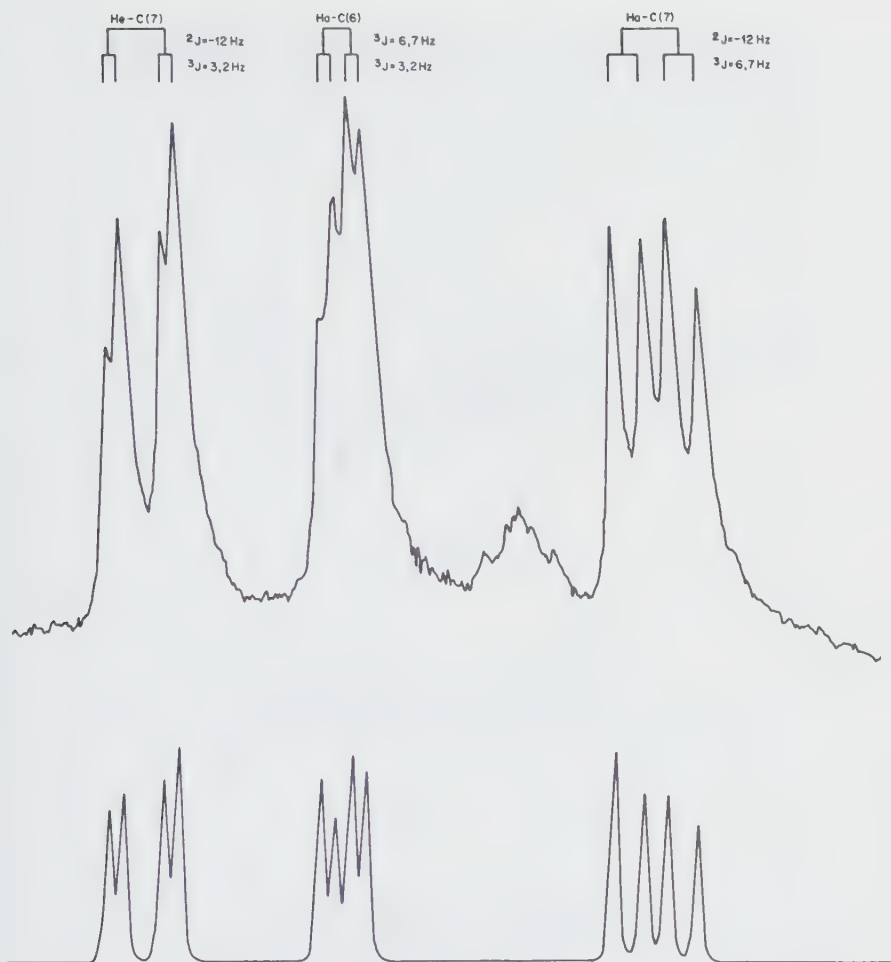


Fig. 7. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (360 MHz) von XXXII im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen in 1N NaOD mit dem entsprechenden computersimulierten Spektrum (das Multipllett zwischen dem M- und X-Teil zeigt die nicht vollständig gegen Deuterium ausgetauschten Wasserstoffatome in Stellung C(9)).

Es resultiert für den Tetrahydropyrazinring in VIII eine Halbsessel-Konformation mit pseudo-äquatorialer Stellung des Substituenten an C(6) (Fig. 8).

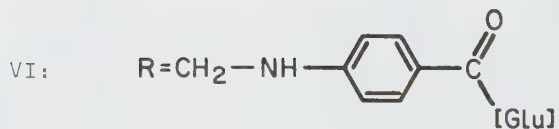
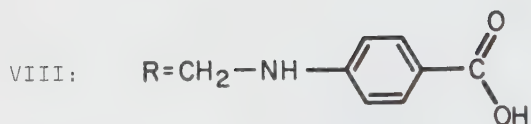
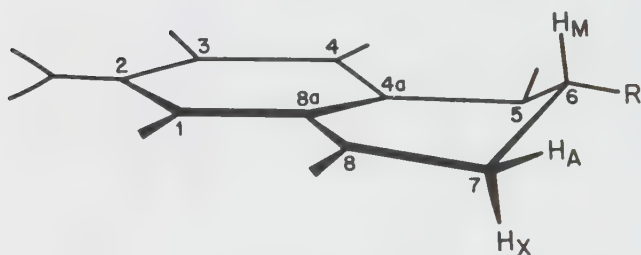
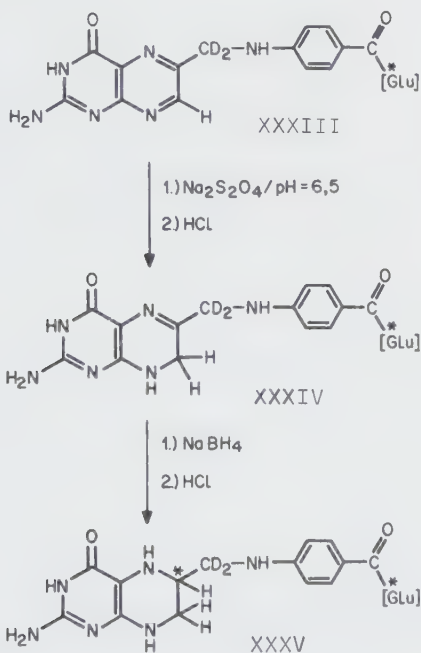


Fig. 8. Räumliche Darstellung der Molekelstrukturen von VIII und VI.

4. Konformationsanalyse von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure

Zur Synthese der zur Konformationsanalyse von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (VI)¹⁾ benötigten deuterierten Verbindung XXXV wurde von XXXIII ausgegangen. Die Synthese folgte analog dem Weg der unter 3 beschrieben wurde. Die Synthese der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure selbst ist in [46] und [47] beschrieben.



Das ¹H-NMR.-Spektrum von XXXV wurde bei 360 MHz aufgenommen (Fig. 9).

1) Im ¹H-, wie auch im ¹³C-NMR.-Spektrum von VI [47] können die wahrscheinlich gebildeten Diastereomeren nicht beobachtet werden.

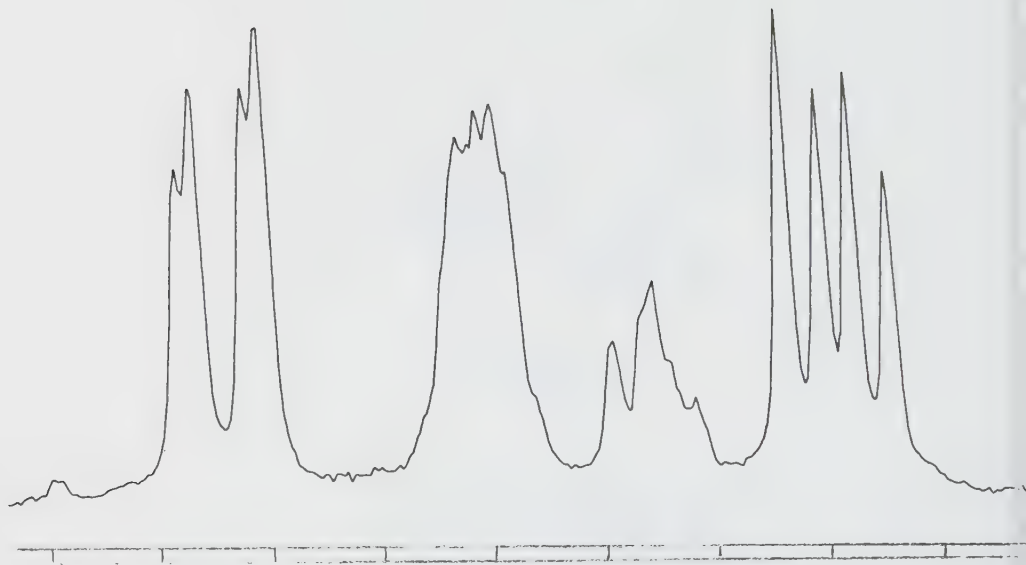


Fig. 9. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (360 MHz) von XXXV im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen in 1N NaOD. Das Multiplett zwischen dem M- und X-Teil zeigt die nicht vollständig gegen Deuterium ausgetauschten Wasserstoffatome in Stellung C(9).

Dieses zeigt ein AMX-System aus welchem die zur Konformationsanalyse benötigten geminalen und vicinalen Kopplungskonstanten herausgelesen werden können.

Das 360-MHz- ^1H -NMR.-Spektrum von XXXII (Fig. 7) stimmt erwartungsgemäss mit demjenigen von XXXV (Fig. 9) im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen überein.

Dies ergibt für den Tetrahydropyrazinring in der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (VI) genau gleich wie in der 5,6,7,8-Tetrahydropterinsäure (VIII) eine Halbsesselkonformation mit pseudo-äquatorialer Stellung des Substituenten an C(6) (vgl. Fig. 8 Seite 34). Auf ähnliche Resultate kam Poe und Hoogsten [50] mit einer ^1H -300-MHz-Studie an 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (VI).

Die Annahme, dass 5,6,7,8-Tetrahydropterinsäure (VIII) ein gutes Modell zur 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (VI) darstellt, die in Abschnitt 2 (Seite 26) getroffen wurde, ist damit ebenfalls bestätigt.

C. Experimenteller Teil

1. Allgemeines

Die ^1H -NMR.-Spektren wurden auf einem Varian T-60- bzw. HA-100- bzw. Bruker-HXS-360-Spektrographen in CF_3COOD , NaOD, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (Standard: Tetramethylsilan) aufgenommen; chemische Verschiebungen in ppm; Abkürzungen: s = Singulett, m = Multiplett, br = breit, H = Proton(en). Alle NaOD-Proben wurden unter Stickstoff in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) hergestellt. Die beschriebenen deuterierten Verbindungen wiesen eine Deuterium-Einbaurate von 92 - 95 % auf. Die Spektrensimulation wurde mit Hilfe des Simulationsprogrammes SIMEQ auf einem Varian-620E-Computer ausgeführt. Die instrumentellen Daten für die rauschentkoppelten und "Off-resonanz"- ^{13}C -NMR.-Spektren finden sich in [51].

2. 6-Formylpterin (X)

Synthese und analytische Daten in [52].

3. N(2')-Acetyl-6-formylpterin (XI)

Synthese und analytische Daten in [42].

4. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-chlor-phenyl)-azomethin]-pterin (XII)

1 g (4,29 mmol) N(2')-Acetyl-6-formylpterin (XI) wurde in

500 ml Aethanol (99 %) gelöst. Wenig Rückstand wurde abfiltriert. Dazu wurden 800 mg (5,95 mmol) p-Chloranilin gegeben und 30 Min. rückflusiert. Die kristalline Fällung wurde filtriert und in kaltem Aethanol (99 %) gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 40⁰, 12 Std.): 1 g (68 %) XII.

¹H-NMR. (60 MHz, CF₃COOD): 10,30 - 9,50 (m, H-C(7), H-C(9)); 8,20 - 7,41 (m, 4 arom. H); 2,52 (s, H₃C-CO-N(2')).

5. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-methoxy-phenyl)-azomethin]-pterin (XIII)

1 g (4,29 mmol) N(2')-Acetyl-6-formylpterin (XI) wurde in 500 ml Aethanol (99 %) gelöst. Wenig Rückstand wurde abfiltriert. Dazu wurden 800 mg (5,95 mmol) p-Anisidin gegeben und 30 Min. rückflusiert. Die kristalline Fällung wurde filtriert und in kaltem Aethanol (99 %) gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 40⁰, 12 Std.): 1 g (69 %) XIII.

¹H-NMR. (60 MHz, CF₃COOD): 9,79 - 9,40 (m, H-C(7), H-C(9)); 8,20 - 6,95 (m, 4 arom. H); 4,02 (s, H₃C-O-); 2,52 (s, H₃C-CO-N(2')).

6. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-chlor-phenyl)-aminomethyl]-pterin (XIV)

200 ml 35proz. Aethanol wurden mit Stickstoff gesättigt und auf 60⁰ erwärmt. Dazu kamen 176 mg (4,65 mmol) Natriumborhydrid und unmittelbar darauf 1 g (2,92 mmol) XII. Die Lösung wurde 5 Min. bei 60⁰ gerührt, und dann wurden weitere 30 mg (0,77 mmol) Natriumborhydrid zugegeben. Nach

10 Min. bei 60° wurde auf 22° abgekühlt und langsam Eis-essig zugetropft, bis ein pH von 4,5 erreicht wurde. Beim Stehenlassen (6 Std., 5°) kristallisierte das Produkt (XIV) aus. Filtration, Waschen mit 50proz. Aethanol und Trocknung (0,01 Torr, 60°, 6 Std.) ergaben 500 mg (50 %) XIV.

¹H-NMR. (60 MHz, CF₃COOD): 9,18 (s, H-C(7)); 7,61 (s, 4 arom. H); 5,22 (s, 2H-C(9)); 2,52 (s, H₃C-CO-N(2')).

7. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-methoxy-phenyl)-aminomethyl]-pterin (XV)

200 ml 35proz. Aethanol wurden mit Stickstoff gesättigt und auf 60° erwärmt. Dazu kommen 176 mg (4,65 mmol) Natriumborhydrid und unmittelbar darauf 1 g (2,95 mmol) XIII. Die Lösung wurde 5 Min. bei 60° gerührt, und dann wurden weitere 30 mg (0,77 mmol) Natriumborhydrid zugegeben. Nach 10 Min. bei 60° wurde auf 22° abgekühlt und langsam Eis-essig zugetropft, bis ein pH von 4,5 erreicht wurde. Beim Stehenlassen (6 Std., 5°) kristallisierte das Produkt aus. Filtration, Waschen mit 50proz. Aethanol und Trocknung (0,01 Torr, 60°, 6 Std.) ergaben 500 mg (50 %) XV.

¹H-NMR. (60 MHz, CF₃COOD): 9,18 (s, H-C(7)); 7,60 und 7,20 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 5,22 (s, 2H-C(9)); 3,94 (s, H₃C-O-); 2,52 (s, H₃C-CO-N(2')).

8. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-methoxycarbonyl-phenyl)-iminomethyl]-pterin (XVII)

Synthese und analytische Daten in [41] und [42].

9. N(2')-Acetyl-9-deuterio-pterinsäure-methylester (XVIII)

200 ml 35proz. Monodeuteroäthanol wurden mit sauerstoff-freiem Stickstoff gesättigt und auf 60° erwärmt. Zugegeben wurden 146 mg (3,50 mmol) Natriumbordeuterid und unmittelbar darauf 1 g (2,74 mmol) XVII. Die Lösung wurde 5 Min. bei 60° gerührt, und dann wurden weitere 24 mg (0,58 mmol) Natriumbordeuterid zugegeben. Nach 10 Min. bei 60° wurde auf 22° abgekühlt und langsam Eisessig zugetropft, bis zum pH von 5,1. Dabei fiel das Produkt aus. Stehenlassen (5°, 12 Std.), Filtration, Waschen mit 50proz. Äthanol und Trocknung (0,01 Torr, 50°, 12 Std.) ergaben 560 mg (61 %) XVIII.

¹H-NMR. (100 MHz, CF₃COOD): 9,20 (s, H-C(7)); 8,33 und 7,87 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H); 5,34 (s, H-C(9)); 4,13 (s, H₃C-OCO-); 2,58 (s, H₃C-CO-N(2')).

10. 9-Deuterio-pterinsäure (XIX)

200 ml 0,1N NaOH wurden mit sauerstofffreiem Stickstoff gesättigt und auf 70° erwärmt. Dazu kamen 1 g (2,72 mmol) XVIII. Die Lösung wurde während 30 Min. bei 70° gerührt, anschliessend auf 22° abgekühlt und das pH mittels Eisessig auf 4,8 gebracht, wobei das Produkt ausfiel. Abzentrifugieren, Waschen mit Eiswasser, Äthanol, Äther und Trocknung (0,01 Torr, 50°, 12 Std.) ergaben 800 mg (94 %) XIX.

¹H-NMR. (100 MHz, CF₃COOD): 9,20 (s, H-C(7)); 8,36 und 7,90 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H); 5,34 (s, H-C(9)).

11. 7,8-Dihydro-9-deuterio-pterinsäure (XX)

Die Verbindung wurde nach einer modifizierten Methode [45] hergestellt. 9 g Ascorbinsäure wurden in 160 ml sauerstofffreiem Wasser gelöst und das pH mittels 1N NaOH auf 6,5 eingestellt. Zu dieser Lösung kamen 10 g (57,4 mmol) Natriumdithionit. Darauf wurde eine Lösung von 1 g (3,2 mmol) XIX in 50 ml 0,2N NaOH zugetropft, das pH mit 1N HCl auf 6,5 korrigiert und nach 10 Min. eine weitere Portion von 5 g (28,7 mmol) Natriumdithionit zugegeben. Nach 3 Std. intensivem Rühren wurde das pH der Suspension mit 1N HCl auf 3,8 gebracht und weitere 30 Min. gerührt. Nach dem Stehenlassen (12 Std., 5⁰) wurde das blass hellgelbe Produkt abzentrifugiert und mit Wasser, Aethanol und Aether gewaschen. Nach 6stdg. Trocknen bei 40⁰ / 0,01 Torr ergaben sich 740 mg (74 %) XX.

¹H-NMR. (60 MHz, 0,6N NaOD) (Fig. 2): 8,20 und 7,06 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 4,40 (s²), 2H-C(7)); 4,25 (s, H-C(9)).

12. 6,9-Dideuterio-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure (XXI)

Die Verbindung wurde nach den Methoden in [46] und [47] hergestellt: 1 g (3,18 mmol) XX wurde in 100 ml stick-

2) Wie aus der Röntgenstrukturanalyse von 6-Methyl-7,8-dihydropterin hervorgeht [53], sind die H-Atome an C(7) äquivalent.

stofffreiem, 50proz. Monodeuteroäthanol aufgeschlämmt. Dazu kamen innerhalb 24 Std. portionenweise 300 mg (7,93 mmol) Natriumbordeuterid. Die entstandene Lösung (pH = 8,5) wurde auf 50 ml eingeeengt und das pH mittels 6N HCl auf 4 eingestellt, worauf das farblose XXI ausfiel. Die Arbeit erfolgte in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂). Zentrifugieren, Waschen mit Eiswasser, wenig kaltem Aethanol und Aether. Nach 6stdg. Trocknen bei 40⁰/0,01 Torr resultierten 530 mg (50 %) XXI.

¹H-NMR. (100 MHz, 1,5N NaOD) (Fig. 3): 8,14 und 7,09 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 3,81 und 3,50 (AB-System, J = 12 Hz, 2H-C(7)); 3,50 (s, H-C(9)).

13. 7,8-Dihydropteroinsäure (XXII)

Die Verbindung wurde nach den modifizierten Methoden [45] dargestellt: 9 g Ascorbinsäure wurden in 160 ml sauerstofffreiem Wasser gelöst und das pH mittels 1N Natronlauge auf 6,5 eingestellt. Zu dieser Lösung kamen 10 g (57,4 mmol) Natriumdithionit. Darauf wurde eine Lösung von 1 g (3,2 mmol) IX [41] in 50 ml 0,2N Natronlauge zugetropft, das pH mit 1N Salzsäure auf 6,5 korrigiert und nach 10 Min. eine weitere Portion von 5 g (28,7 mmol) Natriumdithionit zugegeben. Nach 3 Std. intensivem Rühren der heterogenen Lösung wurde das pH mit 1N Salzsäure auf 3,8 gebracht und weitere 30 Min. gerührt. Nach dem Stehenlassen (12 Std., 5⁰) wurde das blass hellgelbe Produkt XXII abzentrifugiert, gewaschen mit Wasser, Aethanol, Aether und ge-

trocknet (0,01 Torr, 40⁰, 6 Std.): 740 mg (74 %) XXII.

¹H-NMR. (100 MHz, 1,5N NaOD): 8,14 und 7,0 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 4,29 (s²), 2H-C(7)); 4,14 (s, 2H-C(9))³⁾.

¹³C-NMR. (3N NaOD)⁴⁾: 176,0 (C(7')); 170,1 (C(4)); 161,7 (C(2)); 155,2, 152,1, 150,9 (C(1'), C(6), C(8a)); 131,5 (C(3'), C(5')); 124,8 (C(4')); 112,4 (C(2'), C(6')); 103,9 (C(4a)); 48,3 (C(9)); 42,9 (C(7)).

C ₁₄ H ₁₄ N ₆ O ₃	Ber.	C 53,50	H 4,49	N 26,74 %
(314,31)	Gef.	C 53,59	H 4,42	N 26,48 %

14. 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure-monohydrat
(VIII · H₂O)

Die Verbindung wurde nach den modifizierten Methoden [46] und [47] dargestellt: 1 g (3,18 mmol) XXII wurde in 100 ml stickstofffreiem 50proz. Aethanol aufgeschlämmt. Dazu kamen innerhalb 24 Std. portionenweise 300 mg (7,93 mmol) Natriumborhydrid. Die entstandene Lösung (pH = 8,5) wurde auf 50 ml eingengt und das

3) Nach ca. 20 Std. sind an C(9) 50 Proz. der Wasserstoffatome gegen Deuterium ausgetauscht.

4) Die Zuordnung der Signallagen der ¹³C-Atome erfolgte durch Vergleich der chemischen Verschiebungen in [51] und [54].

pH mittels 6N Salzsäure auf 4 eingestellt, worauf das farblose VIII $\cdot$ H₂O ausfiel. Zentrifugation, Waschen mit Eiswasser, wenig kaltem Aethanol, Aether und Trocknung (0,01 Torr, 40°, 6 Std.) ergaben 530 mg (50 %) VIII $\cdot$ H₂O.

¹H-NMR. (100 MHz, 3N NaOD) (Fig. 1): 8,25 und 7,10 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 3,95 - 3,40 (m, H-C(6), 2H-C(7), 2H-C(9)).

¹³C-NMR. (3N NaOD)⁴⁾: 175,9 (C(7')); 166,8 (C(4)); 157,8 (C(2)); 151,2 (C(1'), C(8a)); 131,4 (C(3'), C(5')); 124,6 (C(4')); 112,4 (C(2'), C(6')); 101,3 (C(4a)); 48,8 (C(6)); 45,4, 43,8 (C(7), C(9)).

C ₁₄ H ₁₆ N ₆ O ₃ $\cdot$ H ₂ O	Ber.	C 50,26	H 5,40	N 25,12 %
(334,32)	Gef.	C 50,20	H 4,96	N 24,85 %

15. 6-Deuterio-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure (XXIII)

Die Synthese wurde wie unter 14 beschrieben ausgeführt, jedoch unter Verwendung der entsprechenden deuterierten Reagenzien.

¹H-NMR. (100 MHz, 1,5N NaOD): 8,14 und 7,09 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 3,81 und 3,50 (AB-System, J = 12 Hz, 2H-C(7); 3,58 (s, 2H-C(9)⁵⁾).

5) Die diastereotopen Protonen an C(9) im ¹H-NMR.-Spektrum von XXIII und in der an C(6) entsprechend deuterierten Verbindung von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure [44] weisen zufällig die gleichen chemischen Verschiebungen auf und erscheinen daher als Singulette.

16. N(2')-Acetyl-N(10)-nitroso-pteroidsäuremethyl-
estermonohydrat (XXV)

Die Verbindung wurde nach der modifizierten Methode [48] dargestellt: 1 g (2,71 mmol) XXIV [41] wurde in 65 ml 12N Salzsäure bei 0° gelöst und unter Rühren eine Lösung (0°) von 187 mg (2,71 mmol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch 4 Min. weitergerührt. Dazu kamen 130 ml Wasser (0°), wobei sich eine farblose Fällung von XXV einstellte. Stehenlassen (5°, 1 Std.), Abzentrifugieren, Waschen mit Wasser, Aethanol, Aether und nach 6stdg. Trocknen bei 40°/0,01 Torr ergaben sich 550 mg (51 %) XXV.

¹H-NMR. (60 MHz, (CD₃)₂SO): 8,94 (s, H-C(7)); 8,08 und 7,93 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H); 5,57 (s, 2H-C(9)); 3,89 (s, H₃C-O-C(7')); 2,20 (s, H₃C-CO-N(2')).

C ₁₇ N ₇ O ₅ H ₁₅ · H ₂ O	Ber.	C 49,16	H 4,10	N 23,60 %
(415,33)	Gef.	C 49,94	H 4,40	N 23,68 %

17. 9,9-Dideuterio-N(10)-nitroso-pteroidsäure (XXVI)

Die Verbindung wurde nach der modifizierten Methode [49] dargestellt: 1 g (2,41 mmol) XXV · H₂O wurde in 40 ml 1,5N Natriumdeuteriumoxid gelöst und 5 Std. stehen gelassen. Anschliessend wurde mit 2N Deuteriumchlorid (pH = 3) XXVI ausgefällt. Abzentrifugieren, Waschen mit Aethanol, Aether und Trocknung (0,01 Torr, 40°, 6 Std.) ergaben 750 mg (91 %) XXVI.

$^1\text{H-NMR}$. (60 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): 8,67 (s, H-C(7)); 8,08 und 7,90 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 8$ Hz, 4 arom. H).

18. 9,9-Dideuterio-pteroidsäure (XXVII)

Die Herstellung erfolgte analog [49]. 1 g (2,91 mmol) XXVI wurde in 60 ml 1,5N NaOD gelöst, mit 1 g (5,74 mmol) Natriumdithionit versetzt und die Lösung 3 Tage (22 $^\circ$) stehengelassen. Nach nochmaliger Zugabe von 500 mg (2,87 mmol) Natriumdithionit und weiteren 2 Tagen stehenlassen, wurde auf -3 $^\circ$ abgekühlt und durch Zugabe von 12N HCl (pH = 3) XXVII ausgefällt. Zentrifugieren, Waschen mit Wasser, Aethanol und Aether und 6stdg. Trocknen bei 60 $^\circ$ /0,01 Torr ergaben sich 840 mg (92 %) XXVII.

$^1\text{H-NMR}$. (60 MHz, 2N NaOD): 9,02 (s, H-C(7)); 8,17 und 7,15 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 8$ Hz, 4 arom. H).

19. 9,9-Dideuterio-7,8-dihydropteroidsäure (XXVIII)

Herstellung analog zu 13.

$^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 1N NaOD): 8,19 und 7,15 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 4,35 (s,²) 2H-C(7)).

20. 7,7,9,9-Tetradeuterio-7,8-dihydropteroinsäure (XXIX)

1 g (3,16 mmol) XXVIII wurde in 15 ml 5N Natriumdeuteriumoxid gelöst, 5 Tage stehengelassen und anschliessend mit 12N Deuteriumchlorid (pH = 3) ausgefällt. Zentrifugieren, Waschen mit Wasser, Aethanol, Aether und Trocknung (0,01 Torr, 60⁰, 6 Std.) ergaben 800 mg (79 %) XXIX. Zur Erreichung des geforderten Deuterierungsgrades (vgl. [49]) wurde die gesamte oben beschriebene Reaktion wiederholt was 640 mg (79 %) XXIX ergab (Totalausbeute: 64 %).

¹H-NMR. (60 MHz, 1N NaOD): 8,25 und 7,19 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H).

21. 7,7,9,9-Tetradeuterio-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure-monohydrat (XXX · H₂O)

Die Synthese erfolgte analog zu 14.

¹H-NMR. (100 MHz, 1N NaOD) (Fig. 4): 8,19 und 7,11 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 9 Hz, 4 arom. H); 3,70 (s, H-C(6)).

22. 6,9,9-Trideuterio-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure-monohydrat (XXXI · H₂O)

Die Synthese wurde wie unter 14 beschrieben ausgeführt; für die Reduktion jedoch wurden die entsprechend deuterierten Reagenzien verwendet.

$^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 1N NaOD) (Fig. 5): 8,19 und 7,11 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 3,83 und 3,53 (A- und B-Teil eines AB-Systems, $J = 12$ Hz, 2H-C(7)).

23. 9,9-Dideuterio-5,6,7,8-tetrahydropteroidsäure-monohydrat (XXXII . H_2O)

Die Synthese erfolgte analog 14.

$^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 1N NaOD) (Fig. 6): 8,19 und 7,11 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 3,95 - 3,40 (m, H-C(6) und 2H-C(7)).

$^1\text{H-NMR}$. (360 MHz, 1N NaOD) (Fig. 7): 3,83, 3,71 und 3,54 (A-, M- und X-Teil eines AMX-Systems, $J_{\text{AM}} = 3,2$ Hz, $J_{\text{AX}} = -12$ Hz, $J_{\text{MX}} = 6,7$ Hz, $\text{H}_e\text{-C}(7)$, H-C(6) und $\text{H}_a\text{-C}(7)$)).

24. 9,9-Dideuterio-7,8-dihydrofolsäure (XXXIV)

Bei der Synthese von XXXIV wurde von 9,9-Dideuterio-folsäure (XXXIII) [49] ausgegangen. Die Synthese erfolgte nach [45].

$^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 1,85N NaOD) [44]: 8,18 und 7,23 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 4,94 - 4,76 (m, H-C(α)); 4,43 (s^{21} , 2H-C(7)); 3,00 - 2,40 (m, 2H-C(β) und 2H-C(γ)).

25. 9,9-Dideuterio-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (XXXV)

Die Synthese erfolgte wie unter 23 beschrieben, jedoch unter Verwendung von Wasser als Lösungsmittel.

$^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 1N NaOD): 8,10 und 7,17 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9 \text{ Hz}$, 4 arom. H); 4,85 - 4,64 (m, H-C(α)); 4,00 - 3,39 (m, H-C(6) und 2H-C(7)); 2,90 - 2,30 (m, 2H-C(β) und 2H-C(γ)).

$^1\text{H-NMR}$. (360 MHz, 1N NaOD) (Fig. 9): 3,83, 3,71 und 3,54 (A-, M- und X-Teil eines AMX-Systems, $J_{\text{AM}} = 3,2 \text{ Hz}$, $J_{\text{AX}} = -12 \text{ Hz}$, $J_{\text{MX}} = 6,7 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{B}}\text{-C}(7)$, H-C(6) und $\text{H}_{\text{A}}\text{-C}(7)$)).

D. Zusammenfassung

Im 360-MHz- ^1H -NMR.-Spektrum von (6 R, S)-9,9-Dideuterio-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure (razemisch) (XXXII) (AMX-System, Fig. 7) und (6 R, S)-9,9-Dideuterio-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (diastereomer) (XXXV) (AMX-System, Fig. 9) zeigen $\text{H}_a\text{-C}(6)$ und $\text{H}_a\text{-C}(7)$ eine vicinale Kopplungskonstante von 6,7 Hz und $\text{H}_a\text{-C}(6)$ und $\text{H}_e\text{-C}(7)$ eine von 3,2 Hz. Die erste Kopplungskonstante belegt eine ungefähr trans-diaxiale Anordnung von $\text{H}_a\text{-C}(6)$ und $\text{H}_a\text{-C}(7)$, die zweite eine gauche Konformation von $\text{H}_a\text{-C}(6)$ und $\text{H}_e\text{-C}(7)$. Der Tetrahydropyrazinring in der razemischen 5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure (VIII) und in der diastereomeren 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (VI) liegt daher in einer Halb-Sessel-Konformation mit einer pseudo-äquatorialen Position der Seitenkette am C(6) vor (Fig. 8).

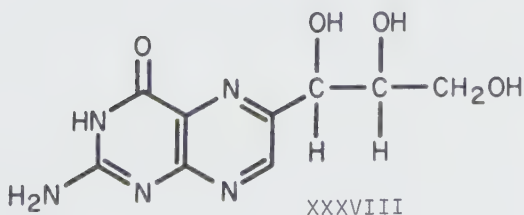
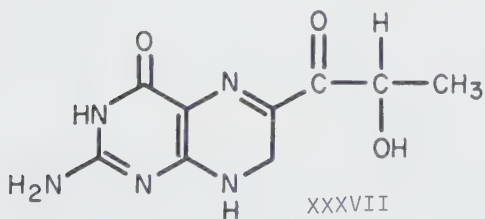
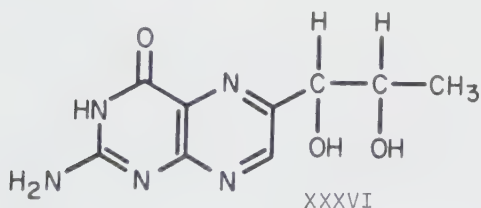
Zweiter Teil

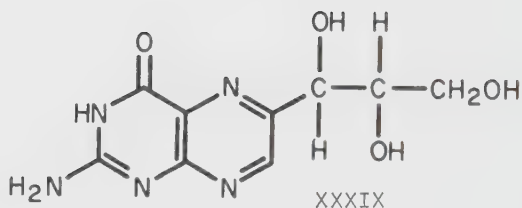
Diastereomerentrennung von 5,6,7,8-Tetra-
hydro-L-neopterin und 5,6,7,8-Tetrahydro-
L-biopterin

A. Allgemeiner Teil

1. Pterine mit Polyhydroxy-Seitenketten

Neben dem Pterin selbst (II) kommen in der Natur sehr viele substituierte Derivate desselben vor, insbesondere solche mit Polyhydroxy-Seitenketten. Diese Seitenketten sind bei den natürlichen Derivaten mit wenigen Ausnahmen, an der C(6)-Stellung mit dem Pterinringsystem verknüpft.





Wichtige Vertreter sind das gleichzeitig von verschiedenen Forschungsgruppen isolierte L-Biopterin (XXXVI) [11] [55 - 58], mit einer L-erythro-1',2'-Dihydroxypropyl-Seitenkette, das dazu isomere Sepiapterin (XXXVII) [59] [60], ferner das D-Neopterin (XXXVIII) [61] und das L-Monapterin (XXXIX) [62], welche eine D-erythro- bzw. eine L-threo-Trihydroxypropyl-Seitenkette aufweisen. Durch die Relation zu den Pentosen erklärt sich auch die Zugehörigkeit der verschiedenen Pterine zur L-, resp. D-Reihe.

1.1. Vorkommen von L-Biopterin

Das Biopterin (XXXVI) ist im ganzen Tierreich verbreitet, man findet es sowohl im Einzeller, wie auch in den hochentwickelten Säugern. Aber auch im Pflanzenreich liess sich die Verbindung nachweisen, so in verschiedenen Algenarten. Eine umfassende Uebersicht über Vorkommen und Verbreitung der Pterine im Tier- und Pflanzenreich findet sich in [32].

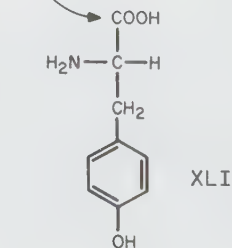
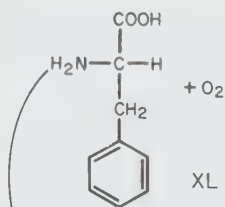
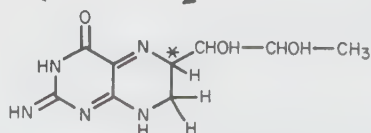
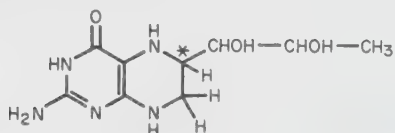
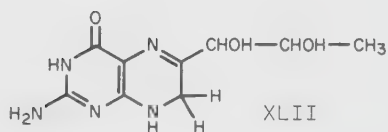
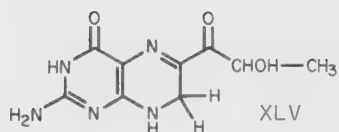
1.2. Vorkommen von D-Neopterin

Ein weiteres Pterin, strukturell nahe verwandt mit Biopterin (XXXVI) wurde in Insekten und Bakterien gefunden. So wurde aus 2000 Larven der Honigbiene von Rembold und Buschmann [63] Neopterin (XXXVIII) isoliert. Auch im menschlichen Urin wurde das D-Neopterin neben anderen Pterinen gefunden. Fukushima und Shioto [64] fanden, dass pro Person und Tag 1 mg L-Biopterin (XXXVI) und 0,4 mg D-Neopterin (XXXVIII) ausgeschieden werden. Es wird für möglich gehalten, dass alles Biopterin in der Dihydro- oder in der Tetrahydroform vorliegt, durch das Isolieren aber zurückoxidiert wird.

2. Physiologische Bedeutung von Biopterin

Schon 1957 isolierte Kaufmann [65] aus Ratten- und Schafsleber ein Enzymsystem, das die Hydroxylierung des Phenylalanins (XL) zum Tyrosin (XLI) katalysierte. Als Cofaktor dieses Enzymsystems wurde NADPH erkannt.

Später [66] wurde das Vorhandensein eines weiteren Cofaktors festgestellt, Kaufmann [67] konnte 1963 dessen Struktur als diejenige von 7,8-Dihydrobiopterin (XLII) angeben. Für den Mechanismus der Phenylalanin-Hydroxylierung fand er folgendes Schema [68]:

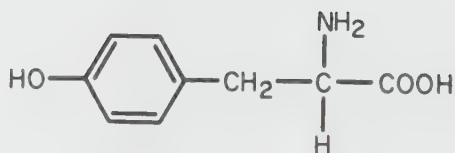


Das Sepiapterin (XLV) wird in einer von Nagai [69] [70] beschriebenen Reaktion zum 7,8-Dihydro-biopterin (XLII) reduziert. Dieses geht ins 5,6,7,8-Tetrahydro-biopterin (XLIII) über, das wahrscheinlich als eigentlicher Cofaktor zu bezeichnen ist. Da die enzymatische Hydrierung stereospezifisch verläuft, wäre es interessant zu wissen, welches von den beiden synthetisch gebildeten Diastereomeren dem natürlichen entspricht.

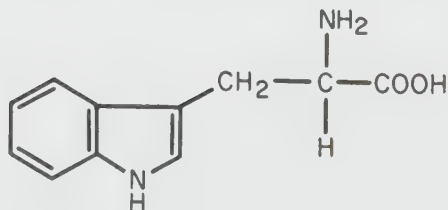
Untersuchungen des Mechanismus der Hydroxylierung an Phenylalanin enthaltenden Peptiden in vitro [71 - 73] schlagen einen Radikalmechanismus unter Mitwirkung des $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ -Redoxsystems vor. Die Existenz einer parachinoiden Struktur wie sie XLIV darstellt, wird von Viscontini [74] bezweifelt.

Nach einem gleichen Mechanismus verläuft die Hydroxylierung des Tyrosins zu Dopa (XLVI), einer Vorstufe des Adrenalins. Die Rolle der Tetrahydropterine als Cofaktoren der L-Tyrosin-Hydroxylase beschrieben Brenneman und Kaufmann [75] sowie Ellenbogen [76].

Durch Umsetzen von Tryptophan (XLVII) mit Tetrahydropterin und Fe^{II} in Gegenwart von Sauerstoff wird eine Hydroxylierung der 3- wie auch der 5-Stellung beobachtet [77]. Zwei Arbeiten befassen sich mit der 5-Hydroxylierung im Gehirn [78] [79], wobei eine eindeutige Abhängigkeit des Enzymsystems von einem Tetrahydropterin nachgewiesen werden konnte.



XLVI



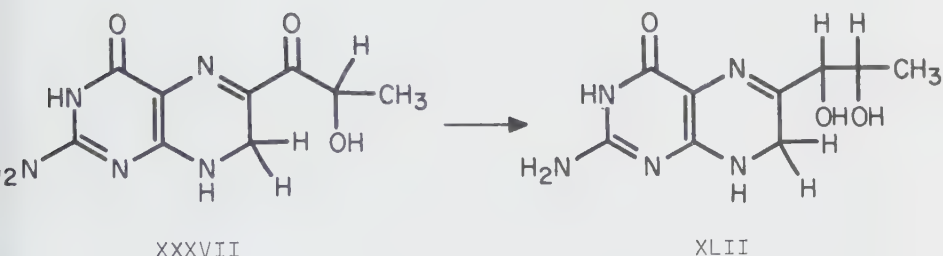
XLVII

Ausser der Coenzym-Wirkung für die Hydroxylierung von Phenylalanin (XL), Tyrosin (XLVI) und Tryptophan (XLVII), ist das Biopterin (XXXVI) ein unentbehrlicher Wachstumsfaktor für die Trypanosomid Flagellaten *Crithidia fasciculata* [55]. Der auf dieser Wirkung beruhende Wachstumstest war lange Zeit die einzige Methode um sehr kleine Mengen von Biopterin nachzuweisen. Eine Uebersicht über die Methode gibt Guttman [80].

3. Biogenese von Biopterin

Das Sepiapterin (XXXVII) spielt in der Biosynthese des Biopterins eine wichtige Rolle. Die Biogenese des Sepiapterins [81] [82] ist noch relativ unklar.

Sicher ist, dass das phosphorylierte Neopterin (XXXVIII) eine Vorstufe des Sepiapterins darstellt. Das Sepiapterin ist selbst die unmittelbare Vorstufe zum Biopterin. Der wichtigste Schritt ist wohl die durch das Enzym Sepiapterin-Reduktase katalysierte Reduktion der 1'-Carbonylgruppe zum 7,8-Dihydrobiopterin (XLII) [69].



B. Theoretischer Teil zu den eigenen Arbeiten

1. Eine allgemeine Einführung

1966 untersuchten Rembold und Metzger [83] die Reduktion von Biopterin (XXXVI) zu Tetrahydrobiopterin (XLIII). Als Reduktionsmittel setzten sie Zink mit Salzsäure, Natriumborhydrid und Natriumdithionit ein, sie führten auch die katalytische Reduktion mit PdO durch. Eine von Viscontini [84] [85] eingeführte Hydrierung von Pterinen in Trifluoressigsäure eignet sich bestens, will man grössere Mengen des tetrahydrierten Pterins erhalten.

Wie die ^1H -NMR.- und ^{13}C -NMR.-Spektren [86] zeigen, liegt das Tetrahydrobiopterin (XLIII), nachdem in C(6)-Stellung des racemischen Biopterins (XXXVI) ein weiteres chirales Zentrum eingeführt wurde, als Diastereomerenmischung vor. Das gleiche gilt für Tetrahydro-L-neopterin (XLVIII) [85]. Die Mischungsverhältnisse lassen sich mit Hilfe der ^{13}C -NMR.-Spektren abschätzen. Im Falle des Tetrahydrobiopterins (XLIII) ergibt sich ein Verhältnis der beiden Diastereomeren von 2 zu 1. Beim Tetrahydro-L-neopterin (XLVIII) ein solches von 3 zu 2. Enzymatisch wird nur ein Diastereomeres gebildet. Vermutlich sind aber beide durch chemische Reduktion gebildeten Diastereomeren biologisch aktiv. Es ist versucht worden eines der beiden Diastereomeren durch Umkristallisation anzureichern [87]. Mittels Hochdruckflüssig-Chromatografie ist es gelungen eine Trennung der beiden Diastereomeren zu erreichen und deren verschiedene UV-, und CD-Spektren zu messen [88]. In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der

chemischen Reduktion mit PtO_2 -Katalysator das natürliche Isomere bevorzugt gebildet wird. In dieser Arbeit nun wird die chemische Trennung der Diastereomeren durch Derivatisierung der Moleküle Tetrahydro-L-neopterin (XLVIII) sowie Tetrahydro-L-biopterin (XLIII) und anschließende fraktionierte Umkristallisation beschrieben. Eine Methode, die beide Isomere ohne Schwierigkeiten in grösseren Mengen rein liefert. ^1H -NMR.- und ^{13}C -NMR.-spektroskopisch kann die Trennung in die beiden Isomeren durch die Fraktionierung genau verfolgt werden. Im Hinblick auf die "atypische" Phenylketonurie (PKU), eine angeborene Stoffwechselkrankheit, könnte es sehr interessant sein, wenn man anstelle des Diastereomeren-gemisches nur ein Isomeres, das aktivere, den Patienten verabreichen könnte. Untersuchungen der "normalen" PKU, die zu Schwachsinn und Entwicklungsstörungen führt, sind von Jervis und Udenfriend [89] [90] durchgeführt worden. Nach der Arbeit von Kaufman [91] ist diese Stoffwechselkrankheit nicht eine Folge des Fehlens des Cofaktors Tetrahydrobiopterin (XLIII), sondern des Apoenzyms Phenylalaninhydroxylase. Beim erwähnten selteneren Fall, der "atypischen" PKU konnte nach Verabreichung von Tetrahydrobiopterin (XLIII) an Kindern ein Absinken des Phenylalaningehaltes im Blut zum normalen Spiegel sofort beobachtet werden [92].

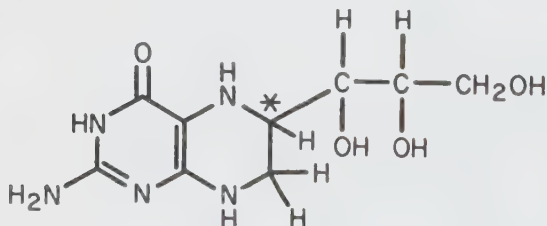
Gegenwärtig wird versucht, das Biopterin (XXXVI) derart zu modifizieren, dass es die Blut-Hirnschranke passieren kann. Die heutigen Produkte sind noch nicht hirngängig. Die in dieser Arbeit beschriebenen Derivate von Biopterin werden in Zukunft auf eben diese Hirngängigkeit hin untersucht. Würde ein Derivat mit diesen Eigenschaften gefunden, so wäre eine direkte Beeinflussung des Hirn-

stoffwechsels auf eine biologisch-natürliche Art möglich.

2. Trennung der Diastereomeren 6R- und 6S-5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin

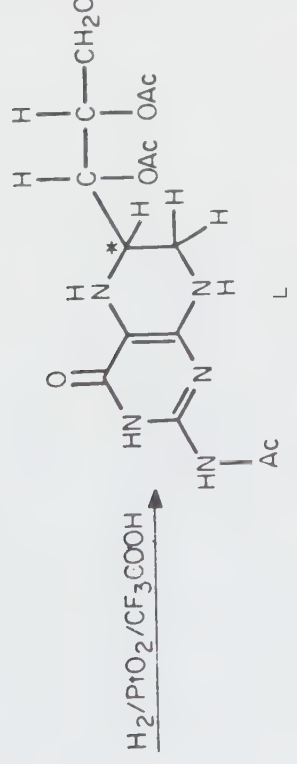
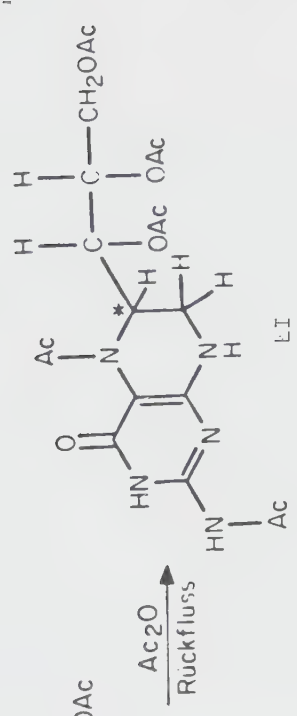
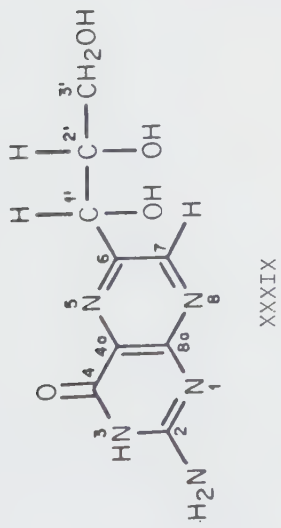
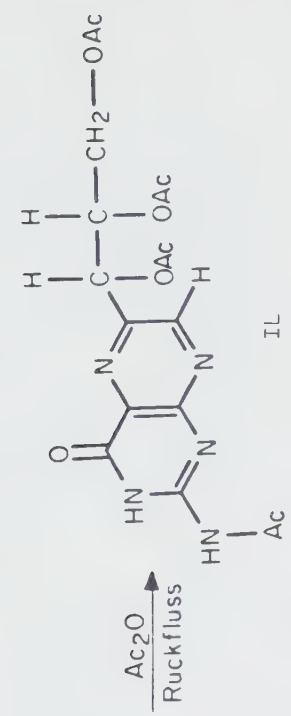
In [85] wurde die Synthese und Charakterisierung (^1H - und ^{13}C -NMR., FD., DC., UV.) der Mischung beider Diastereomeren (6RS)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin (XLVIII) beschrieben.

In Fortsetzung von [85] ist in dieser Arbeit die Trennung der diastereomeren 6R- und 6S-5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin (XLVIII) gelungen [93].



XLVIII

Dabei wurde, ausgehend von L-Neopterin (XXXIX) [94] [95], durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid das Tetraacetyl-Derivat (IL) erhalten. Die Herstellung von L erfolgte durch katalytische Hydrierung in Trifluoressigsäure nach [85] und [84]. Erneute Acetylierung ergab die Mischung 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1,2,3-tri-O-acetyl- (6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterin (LI).



Durch fraktionierte Umkristallisation aus Methanol wurde LI in die acetylierten Diastereomeren LI A und LI B aufgetrennt. Nach salzsaurer Hydrolyse wurden die 6R- und 6S-Diastereomeren von 5,6,7,8-Tetrahydrò-L-neopterin (XLVIII A und XLVIII B) erhalten. Diese liessen sich mittels ^{13}C -NMR.-Spektroskopie und optischer Drehung charakterisieren und deutlich unterscheiden.

Die Zuordnung der Formeln LI A, XLVIII A bzw. LI B, XLVIII B zu den Diastereomeren erfolgte willkürlich, da deren absolute Konfiguration noch nicht bekannt ist.

Die Fig. 10 - 12 zeigen die ^1H -NMR.-Spektren in Bereich der Acetylgruppen vom Gemisch der Diastereomeren LI (Fig. 10), sowie den getrennten Diastereomeren LI A (Fig. 11) und LI B (Fig. 12).

frakt. Kristallisation
aus MeOH

frakt. Kristallisation
aus MeOH

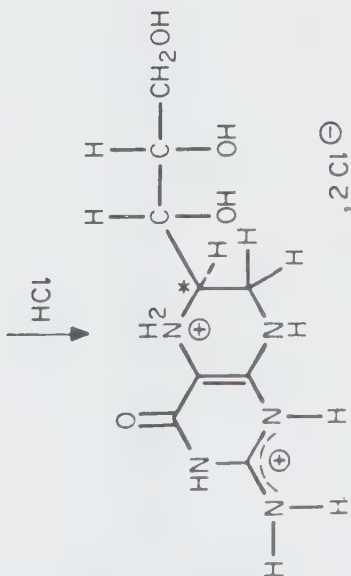
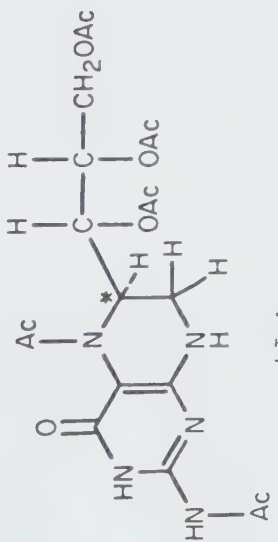
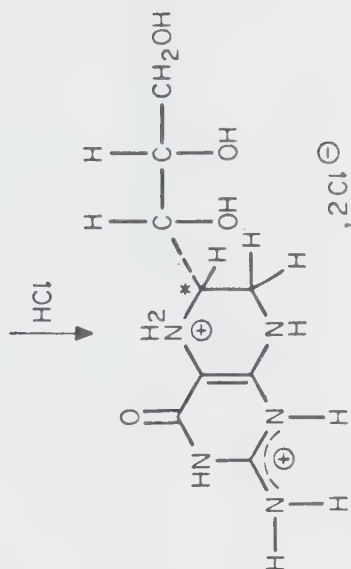
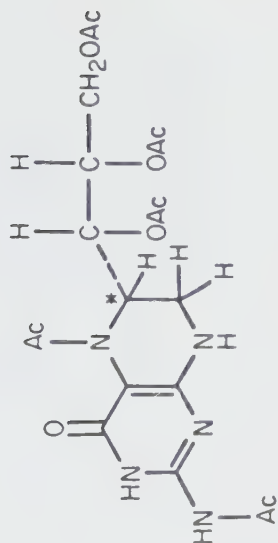




Fig. 10. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (60 MHz, d_5 -Pyridin) von der Mischung (LI) beider pentaacetylierten Diastereomeren LI A und LI B.



Fig. 11. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (60 MHz, d_5 -Pyridin) von pentaacetyliertem LI A.



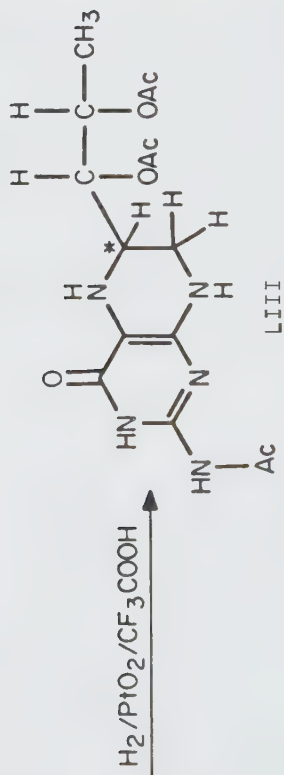
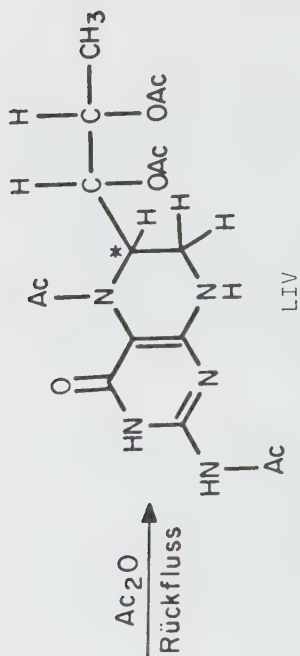
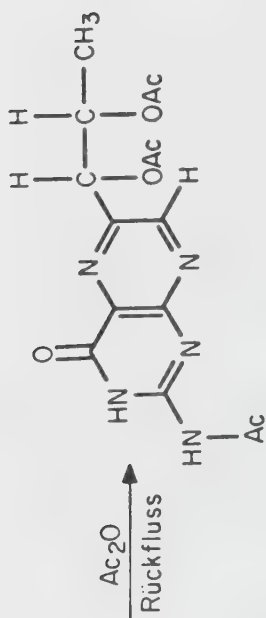
Fig. 12. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (60 MHz, d_5 -Pyridin) von pentaacetyliertem LI B.

3. Trennung der Diastereomeren 6R- und 6S-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin

Da das (6RS)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (XLIII) wie erwähnt erfolgreich bei der Behandlung der sogenannten "atypischen" Phenylketonurie eingesetzt werden konnte [92] [96], drängte sich der Versuch, die Diastereomeren zu trennen, auf.

In Fortsetzung der Synthese und Charakterisierung [86] der Diastereomeren-Mischung (6RS)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (XLIII) wird mit dieser Arbeit die Auftrennung beider Diastereomeren mittels fraktionierter Kristallisation beschrieben [93].

Ausgehend von L-Biopterin (XXXVI) [97], wurde durch Umsetzen mit Essigsäureanhydrid das Triacetyl-Derivat LII erhalten. Die Herstellung von LIII erfolgte durch katalytische Hydrierung in Trifluoressigsäure nach [84] und [86]. Erneute Acetylierung ergab die Mischung der 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2'-di-O-acetyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterine (LIV). Diese Mischung zeigt für Tetrahydropterine günstige chemische Eigenschaften: Oxidationsunempfindlichkeit, gute Löslichkeit in organischen Solventien.



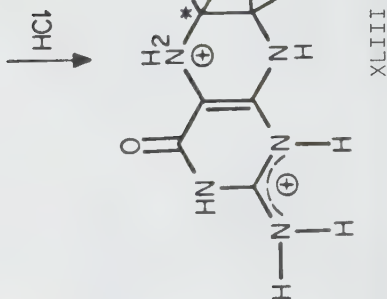
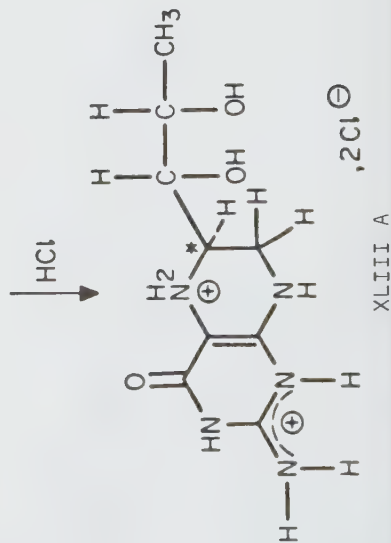
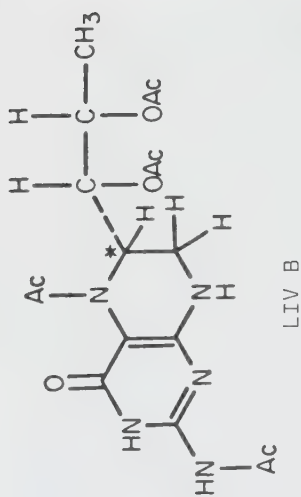
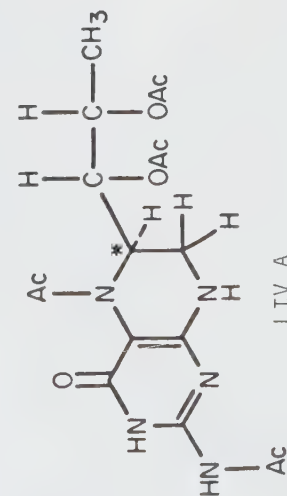
Durch fraktionierte Umkristallisation aus Methanol wurde LIV in die acetylierten Diastereomeren LIV A und LIV B aufgetrennt. Nach salzsaurer Hydrolyse konnten die 6R- und 6S-Diastereomeren von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (XLIII A und XLIII B) in guter Ausbeute rein erhalten werden. Diese lassen sich mittels ^{13}C -NMR.-Spektroskopie und optischer Drehung charakterisieren und deutlich unterscheiden. Durch Vergleich der Daten in [86] und [88], konnte das Diastereomere XLIII A als das natürliche erkannt werden, wobei die C(6)-Konfiguration der Formeln LIV A, XLIII A bzw. LIV B, XLIII B willkürlich angegeben ist, da deren absolute Konfiguration noch nicht bestimmt worden ist.

Die Fig. 13 - 15 zeigen die ^1H -NMR.-Spektren im Bereich der Acetylgruppen vom Gemisch der Diastereomeren LIV (Fig. 13), sowie der getrennten Diastereomeren LIV A (Naturprodukt) (Fig. 14) und LIV B (Fig. 15).

LIV

frakt. Kristallisation
aus MeOH

frakt. Kristallisation
aus MeOH



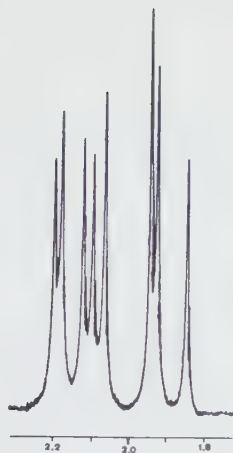


Fig. 13. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) von der Mischung LIV beider tetraacetylierten Diastereomeren LIV A und LIV B.

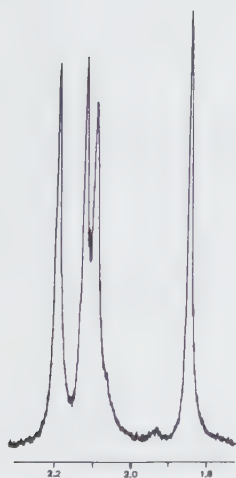


Fig. 14. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) von tetraacetyliertem LIV A.



Fig. 15. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) von tetraacetyliertem LIV B.

C. Experimenteller Teil

1. Allgemeines

Die ^1H -NMR.-Spektren wurden mit einem Varian T-60 bzw. einem EM-390, 90 MHz in CD_3OD , CCl_3 , d_5 -Pyridin, DCl , NaOD , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (Standard: Tetramethylsilan) aufgenommen; chemische Verschiebungen in ppm; Abkürzungen: s = Singulett, m = Multiplett, br = breit, H = Proton(en). Alle DCl und NaOD -Proben wurden unter Stickstoff in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) hergestellt. Die instrumentellen Daten für die rauschentkoppelten und "Off-resonanz"- ^{13}C -NMR.-Spektren finden sich in [51]. Die spezifischen optischen Drehungen $[\alpha]_{589}$ wurden an einem LEP A2 Zeiss-Gerät gemessen; c = Konzentration in %. Die Massenspektren wurden auf einem Varian MAT 112-Gerät (Direkteinlass, 70eV) registriert.

2. 2-N-Acetyl-1',2',3'-tri-O-acetyl-L-neopterin (IL)

1 g (3,95 mmol) XXXIX [94] [95] wurde in 130 ml Essigsäureanhydrid und 40 ml Essigsäure 90 Min. rückflusiert. Nach Einengung der Lösung wurde IL als Öl erhalten. Dieses wurde in Methanol bei 22° aufgenommen und erneut eingengt. Die Aufnahme in Methanol und Einengung zur Trockene wurde solange wiederholt, bis IL in fester Form anfiel. Nach Trocknung (6 Std., $40^\circ/0,01$ Torr) ergaben sich 1,66 g (100 %) IL.

^1H -NMR. (60 MHz, CD_3OD): 8,90 (s, H-C(7)); 6,15 (d, J = 6 Hz, H-C(1')); 5,60 (m, H-C(2')); 4,39 (m, 2H-C(3'));

2,30, 2,17, 2,00, 1,97 (4s, N-Acetylgruppe an C(2) und O-Acetylgruppen an C(1'), (2'), (3')).

^{13}C -NMR. (CDCl_3): 173,9 (C-N-C(2)); 170,3 169,5, 169,3 (C-O-C (1'), (2'), (3')); 159,6 (C(4)); 154,5 (C(2)); 149,9, 149,5, 149,0 (C(8a), (6), (7)); 130,4 (C(4a)); 72,0 (C(1')); 71,3 (C(2')); 61,5 (C(3')); 25,0 (H_3C -CO-N-C(2)); 20,7, 20,7, 20,6 (H_3C -CO-O-C(1'), (2'), (3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = -75,6 \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,7$; CHCl_3).

$\text{C}_{17}\text{N}_{19}\text{O}_8$	Ber.	C 48,47	H 4,51	N 16,63 %
(421,21)	Gef.	C 47,98	H 4,48	N 17,04 %

3. 2-N-Acetyl-1',2',3'-tri-O-acetyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterin-dihydrochlorid (L · 2 HCl)

Nach der Vorhydrierung von 300 mg PtO_2 in 50 ml Trifluoressigsäure (22°) wurde 1 g (2,37 mmol) IL zugegeben. Nach 30 Min. war die Hydrierung beendet (760 Torr, 22°). Anschliessend wurde unter Stickstoff vom Katalysator abfiltriert, die farblose Lösung mittels flüssigem Stickstoff ausgefroren und mit einer Lösung (0°) von 1,5 ml 12N HCl, 18 ml Methanol und 180 ml Aether überschichtet. Nach dem Auftauen und Durchmischen wurde L · 2 HCl abzentrifugiert, mit sauerstofffreiem Aether in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) gewaschen und getrocknet (24 Std., $50^\circ/0,01$ Torr): 830 mg (70,3 %) L · 2 HCl.

^1H -NMR. (60 MHz, d_5 -Pyridin): 5,80 - 5,60 (m, 2H-C(1') (2')); 4,75 - 4,40 (m, 2H-C(3')); 3,80 - 3,42 (3H-C(6) (7)); 2,40 - 1,83 (m, N-Acetylgruppe an C(2) und O-Acetylgruppen an C(1'), (2'), (3')).

^{13}C -NMR. (d_5 -Pyridin): 173,0, 172,9 (C-N-C(2)); 170,5, 170,4, 170,4, 170,2, 170,1, 170,1 (C-O-C(1'), (2'), (3'))); 155,5, 154,9 (C(4)); 147,8, 147,7 (C(2)); 143,7, 143,6 (C(8a)); 105,0, 104,6 (C(4a)); 72,0, 71,4, 71,3 (C(1'), (2'))); 62,2, 61,9 (C(3'))); 48,1, 47,2 (C(6)); 43,5, 42,5 (C(7)); 24,2 ($\text{H}_3\text{C-CO-N-C(2)}$); 20,8, 20,7 ($\text{H}_3\text{C-CO-O-C(1'), (2'), (3')}$)).

$[\alpha]_{589}^{23} = -43,4 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,35$; CH_3OH).

4. 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2',3'-tri-O-acetyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterin-monohydrat (LI $\cdot$ H_2O)

1 g (2,0 mmol) L wurde in 80 ml Essigsäureanhydrid 30 Min. rückflusiert und weitere 3 Std. (22°) gerührt. Bis L vollständig gelöst war, wurde in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) gearbeitet. Nach Einengung der Lösung wurde LI als Öl erhalten. Dieses wurde in Methanol bei 22° aufgenommen und erneut eingeengt. Die Aufnahme in Methanol und Einengung zur Trockene wurde solange wiederholt, bis LI in fester Form anfiel. Nach Trocknung (6 Std., $40^\circ/0,01$ Torr) ergaben sich 970 mg (100 %) LI $\cdot$ H_2O .

^1H -NMR. (60 MHz, d_5 -Pyridin) (Fig. 10): 5,85 - 5,55 (m, 3H-C(6), (7)); 5,00 - 4,50 (m, 2H-C(1'), (2'))); 3,90 - 3,40 (m, 2H-C(3'))); 2,53, 2,52 (2s, N-Acetylgruppe an C(2)); 2,17, 2,16, 2,03, 2,00, 1,97, 1,96, 1,85, 1,84 (8s, N(5)-Acetylgruppe und O-Acetylgruppen an C(1'), (2'), (3'))).

$[\alpha]_{589}^{23} = -111 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,52$; CHCl_3)

MS. m/e [(rel. %)] : 467 (M^+ , 5), 425 (50), 208 (100), 166 (20).

$C_{19}H_{25}N_5O_9 \cdot H_2O$ (485,23)	Ber.	C 47,03	H 5,56	N 14,42 %
	Gef.	C 46,73	H 5,94	N 14,00 %

5. 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2',3'-tri-O-acetyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterin-monohydrat (LI A · H_2O)

1 g (2,06 mmol) LI · H_2O wurde in 200 ml Methanol bei 60° gelöst, stehengelassen (48 Std., 0°), wobei LI A auskristallisierte. LI A wurde noch zweimal aus Methanol umkristallisiert, filtriert, mit Aether gewaschen und getrocknet (6 Std., 50°/0,01 Torr): 360 mg (36 %) LI A · H_2O .

1H -NMR. (60 MHz, d_5 -Pyridin) (Fig. 11): 5,85 - 5,55 (m, 3H-C(6), (7)); 5,00 - 4,70 (m, 2H-C(1'), (2')); 3,60 - 3,40 (m, 2H-C(3')); 2,53 (s, N-Acetylgruppe an C(2)); 2,17, 1,97, 1,85, 1,84 (4s, N(5)-Acetylgruppe und O-Acetylgruppen an C(1'), (2'), (3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = +34,2 \pm 0,5^\circ$ (c = 1,0; Pyridin).

6. 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2',3'-tri-O-acetyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterin-monohydrat (LI B · H_2O)

Die methanolische Mutterlauge (ca. 200 ml), welche unter 5 anfiel, wurde auf 30 ml eingeeengt und stehengelassen (4 Tage, 0°), wobei LI B auskristallisierte. Zur vollständigen Entfernung von LI A musste noch zweimal fraktioniert aus Methanol umkristallisiert werden. Filtration, Waschen mit Aether und Trocknen (6 Std., 50°/0,01 Torr) ergaben 250 mg (25 %) LI B · H_2O .

$^1\text{H-NMR}$. (60 MHz, d_5 -Pyridin) (Fig. 12): 5,85 - 5,55 (m, 2H-C(3')); 5,00 - 4,70 (m, 2H-C(1'), (2')); 3,90 - 3,40 (m, 2H-C(3')); 2,52 (s, N-Acetylgruppe an C(2)); 2,16, 2,03, 2,00, 1,96 (4s, N(5)-Acetylgruppe und O-Acetylgruppen an C(1'), (2'), (3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = -3,8 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,06$; Pyridin).

7. (6R oder S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin-dihydrochlorid (XLVIII A)

1 g (2,06 mmol) LI A $\cdot$ H₂O wurde in 200 ml 3N HCl in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂) bei 22^o gelöst und 3 Std. gerührt. Es wurde alsdann zur Trockene eingeeengt und getrocknet (24 Std., 50^o/0,01 Torr): 680 mg (100 %) XLVIII A $\cdot$ 2 HCl.

$^1\text{H-NMR}$. (60 MHz, 3,0N DCl): 4,80 - 4,25 (m, 7H-C(6), (7), (1'), (2'), (3')).

$^{13}\text{C-NMR}$. (3,0N NaOD): 166,9 (C(4)); 157,4 (C(2)); 151,3 (C(8a)); 101,2 (C(4a)); 73,2 (C(1')); 72,4 (C(2')); 63,8 (C(3')); 52,8 (C(6)); 41,8 (C(7)).

$[\alpha]_{589}^{23} = -31,3 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,69$; 0,1N HCl).

8. (6R oder S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin-dihydrochlorid (XLVIII B)

1 g (2,06 mmol) LI B $\cdot$ H₂O wurde wie unter 7 beschrieben behandelt: 680 mg (100 %) XLVIII B $\cdot$ 2 HCl.

$^1\text{H-NMR}$. (60 MHz, 3,0N DCl). Mit den Daten von 7 identisch.

$^{13}\text{C-NMR}$. (3,0N NaOD): 166,6 (C(4)); 157,3 (C(2)); 151,0 (C(8a)); 101,6 (C(4a)); 73,0 (C(1')); 72,3 (C(2')); 63,5 (C(3')); 51,8 (C(6)); 42,8 (C(7)).

$[\alpha]_{589}^{23} = +43,2 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,58$; 0,1N HCl).

9. 2-N-Acetyl-1',2'-di-O-acetyl-L-biopterin (LII)

1 g (4,22 mmol) L-Biopterin (XXXVI) [97] wurde in 150 ml Essigsäureanhydrid und 40 ml Essigsäure 90 Min. rückflusiert. Nach Filtration der leicht trüben Lösung wurde diese nochmals 60 Min. rückflusiert. Einengung der Lösung ergab LII als Öl. Dieses wurde in Aethanol bei 22° aufgenommen und erneut eingengt. Die Aufnahme in Aethanol und Einengung zur Trockene wurde solange wiederholt, bis LII in fester Form anfiel. Nach Trocknung (6 Std., $40^\circ/0,01$ Torr) ergaben sich 1,53 g (100 %) LII.

$^1\text{H-NMR}$. (90 MHz, CDCl_3): 9,0 (s, H-C(7)); 6,10 (d, $J = 5$ Hz, H-C(1')); 5,50 (m, H-C(2')); 2,53, 2,20, 2,02 (3s, N-Acetylgruppe an C(2) und O-Acetylgruppen C(1'), (2')); 1,28 (d, $J = 6$ Hz, 3H-C(3')).

$^{13}\text{C-NMR}$. (CDCl_3): 173,9 (C-N-C(2)); 169,7, 169,5 (C-O-C(1'), (2')); 159,8 (C(4)); 154,4 (C(2)); 150,1, 149,9, 149,0 (C(8a), (6), (7)); 130,3 (C(4a)); 75,7 (C(1')); 70,5 (C(2')); 25,0 ($\text{H}_3\text{C-CO-N-C(2)}$); 21,0, 20,9 ($\text{H}_3\text{C-CO-O-C(1')}$, (2')); 15,7 (C(3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = -105 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; CHCl_3).

$C_{15}H_{17}N_5O_6$	Ber.	C 49,56	H 4,68	N 19,27 %
(363,19)	Gef.	C 49,13	H 4,84	N 18,67 %

10. 2-N-Acetyl-1',2'-di-O-acetyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid (LIII * HCl)

Nach der Vorhydrierung von 300 mg PtO_2 in 50 ml Trifluoressigsäure (22°) wurde 1 g (2,37 mmol) LII zugegeben. Nach 90 Min. war die Hydrierung beendet (760 Torr, 22°). Anschliessend wurde unter Stickstoff vom Katalysator abfiltriert, die farblose Lösung mittels flüssigem Stickstoff ausgefroren und mit einer Lösung (0°) von 1,5 ml 12N HCl, 18 ml Methanol und 180 ml Aether überschichtet. Nach dem Auftauen und Durchmischen wurde LIII * 2 HCl abzentrifugiert, mit sauerstofffreiem Aether in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) gewaschen und getrocknet (24 Std., 50°/0,01 Torr): 880 mg (72,7 %) LIII * 2 HCl.

1H -NMR. (90 MHz, d_5 -Pyridin): 5,80 - 5,30 (m, 2H-C(1'), (2')); 3,90 - 3,35 (3H-C(6), (7)); 2,32 - 1,95 (m, N-Acetylgruppe an C(2) und O-Acetylgruppen an C(1'), (2')); 1,63 - 1,20 (m, 3H-C(3')).

^{13}C -NMR. (d_5 -Pyridin): 172,9, 172,8 (C-N-C(2)); 170,3, 170,2, 170,1, 170,0 (C-O-C(1'), (2')); 155,4, 154,7 (C(4)); 148,0, 147,6 (C(2)); 143,7 (C(8a)); 104,9, 104,9 (C(4a)); 73,6, 73,1 (C(1')); 70,0, 69,6 (C(2')); 49,7, 48,5 (C(6)); 43,2, 41,9 (C(7)); 24,2 (H_3C -CO-N-C(2)); 21,3, 21,0, 20,8 (H_3C -CO-C(1'), (2')); 14,7 (C(3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = -55^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,1; CH_3OH).

11. 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2'-di-O-acetyl-(6RS)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (LIV)

1 g (2,27 mmol) LIII + 2 HCl wurde in 80 ml Essigsäureanhydrid während 60 Min. rückflusiert und weitere 3 Std. (22°) gerührt. Bis LIII vollständig gelöst war, wurde in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂) gearbeitet. Nach Einengung der Lösung wurde LIV als Öl erhalten. Dieses wurde in Methanol bei 22° aufgenommen und erneut eingengt. Die Aufnahme in Methanol und Einengung zur Trockene wurde solange wiederholt, bis LIV in fester Form anfiel. Nach Trocknung (6 Std., 40°/0,01 Torr) ergaben sich 937 mg (100 %) LIV.

¹H-NMR. (90 MHz, (CD₃)₂SO) (Fig. 13): 7,45 (m, br, H-N(8)); 5,10 - 4,62 (m, 3H-C(6), (7)); 3,55 - 3,00 (m, 2H-C(1'), (2')); 2,20, 2,19 (2s, N-Acetylgruppe an C(2)); 2,13, 2,10, 2,07, 1,95, 1,93, 1,85 (6s, N(5)-Acetylgruppe und O-Acetylgruppen an C(1'), (2')); 1,21 (d, J = 6 Hz, 3H-C(3')).

MS. [m/e (rel. %)]: 409 (M⁺, 5), 367 (80), 208 (100), 166 (20).

[α]_D²³₅₈₉ = +12,0 ± 0,5° (c = 3,0; (CH₃)₂SO).

C ₁₇ H ₂₃ N ₅ O ₇	Ber.	C 49,89	H 5,62	N 17,10 %
(409,19)	Gef.	C 49,90	H 6,07	N 16,89 %

12. 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2'-di-O-acetyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (LIV A)

1 g (2,44 mmol) LIV wurde in 25 ml Methanol bei 60° gelöst, stehengelassen (48 Std., 0°), wobei LIV A aus-

kristallisierte. LIV A wurde noch zweimal aus Methanol umkristallisiert, filtriert, mit Aether gewaschen und getrocknet (6 Std., $50^{\circ}/0,01$ Torr): 340 mg (34 %) LIV A.

$^1\text{H-NMR}$. (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) (Fig. 14): 7,45 (m, br, H-N(8)); 5,10 - 4,62 (m, 3H-C(6), (7)); 3,55 - 3,00 (m, 2H-C(1'), (2')); 2,20 (s, N-Acetylgruppe an C(2)); 2,13, 2,10, 1,85 (3s, N(5)-Acetylgruppe und O-Acetylgruppen an C(1'), (2')); 1,21 (d, $J = 6$ Hz, 3H-C(3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = +12,0 \pm 0,5$ ($c = 0,66$, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$).

13. 2-N-Acetyl-N(5)-acetyl-1',2'-di-O-acetyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (LIV B)

Die methanolische Mutterlauge (ca. 25 ml), welche unter 12 anfiel, wurde auf 10 ml eingeeengt und stehengelassen (4 Tage, 0°), wobei LIV B auskristallisierte. Zur vollständigen Entfernung von LIV A musste noch zweimal fraktioniert aus Methanol umkristallisiert werden. Filtration, Waschen mit Aether und Trocknen (6 Std., $50^{\circ}/0,01$ Torr) ergaben 200 mg (20 %) LIV B.

$^1\text{H-NMR}$. (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) (Fig. 15): 7,45 (m, br, H-N(8)); 5,10 - 4,62 (m, 3H-C(6), (7)); 3,55 - 3,00 (m, 2H-C(1'), (2')); 2,19 (s, N-Acetylgruppe an C(2)); 2,07, 1,95, 1,93 (3s, N(5)-Acetylgruppe und O-Acetylgruppen an C(1'), (2')); 1,21 (d, $J = 6$ Hz, 3H-C(3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = -3,8 \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 0,68$, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$).

14. (6R oder S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid (XLIII A • 2 HCl)

1 g (2,44 mmol) LIV A wurde in 100 ml 3N HCl in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂) bei 22⁰ gelöst und 4 Tage stehengelassen. Es wurde alsdann zur Trockene eingeeengt und getrocknet (24 Std., 50⁰/0,01 Torr): 760 mg (100 %) XLIII A • 2 HCl.

¹H-NMR. (90 MHz, 3,0N DCl): 4,60 - 4,00 (m, 5H-C(6), (7), (1'), (2')); 1,60 (d, J = 6 Hz, 3H-C(3')).

¹³C-NMR. (1,0N NaOD): 166,6 (C(4)); 157,4 (C(2)); 151,1 (C(8a)); 100,7 (C(4a)); 73,8 (C(1')); 68,3 (C(2')); 51,9 (C(6)); 41,9 (C(7)); 17,0 (C(3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = -6,8 \pm 0,5^0$ (c = 0,68; 0,1N HCl).

15. (6R oder S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin-dihydrochlorid (XLIII B • 2 HCl)

1 g (2,44 mmol) LIV B wurde wie unter 14 beschrieben behandelt: 760 mg (100 %) XLIII B • 2 HCl.

¹H-NMR. (90 MHz, 3,0N DCl): Mit den Daten in 14 identisch.

¹³C-NMR. (1,0N NaOD): 165,7 (C(4)); 157,1 (C(2)); 150,8 (C(8a)); 100,8 (C(4a)); 74,3 (C(1')); 67,3 (C(2')); 51,1 (C(6)); 42,3 (C(7)); 16,1 (C(3')).

$[\alpha]_{589}^{23} = +41,6 \pm 0,5^0$ (c = 1,5; 0,1N HCl).

D. Zusammenfassung

Die Mischung der Diastereomeren des Pentaacetylderivates von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-neopterin, sowie die Mischung der Diastereomeren des Tetraacetylderivates von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin, konnte durch fraktionierte Kristallisation in Methanol in die Diastereomeren aufgetrennt werden.

Hydrolyse mit Salzsäure liefert die reinen, diastereomeren, 6R- und 6S-5,6,7,8-tetrahydro-L-neopterine bzw. 6R- und 6S-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterine.

Neben dieser Trennung gelang es mit den acetylierten Pterinderivaten oxidationsunempfindliche, in organischen Solventien gut lösliche tetrahydrierte Pterine zu erhalten, was in Zukunft grosse Vorteile in der Handhabung dieser Pterine bieten könnte. Dies z. B. im Hinblick auf die Behandlung von atypischen PKU-Patienten.

Ob biologisch beide Diastereomere von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin gleich aktiv sind, ist noch abzuklären.

4. Literaturverzeichnis

- [1] F.G. HOPKINS, Nature 40, 335 (1889)
- [2] F.G. HOPKINS, Nature 45, 197 (1891)
- [3] F.G. HOPKINS, Proc. Roy. Soc. London, 57, 5 (1895)
- [4] F.G. HOPKINS, Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B 186, 661 (1895)
- [5] H. WIELAND & C. SCHOEPPF, Ber. Deut. Chem. Ges. 58, 2178 (1925)
- [6] C. SCHOEPPF & H. WIELAND, Ber. Deut. Chem. Ges. 59, 2067 (1926)
- [7] R. PURRMANN, Liebigs Ann. Chem. 544, 182 (1940)
- [8] R. PURRMANN, Liebigs Ann. Chem. 546, 98 (1940)
- [9] C. SCHOEPPF & R. REICHERT, Liebigs Ann. Chem. 548, 82 (1941)
- [10] M. VISCONTINI & H. STIERLIN, Helv. 46, 51 (1962)
- [11] M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, Helv. 38, 397 (1955)
- [12] G.H. SCHMIDT & M. VISCONTINI, Helv. 45, 1571 (1962)
- [13] W. PFLEIDERER, E. LIEDEK, R. LOHRMANN & M. RUKWIED, Chem. Ber. 93, 2015 (1960)
- [14] R.B. ANGIER, J.H. BOOTHE, B.L. HUTCHINGS, J.H. MOWAT, J. SEMB, E.L.R. STOKSTAD, Y. SUBBA-ROW, C.W. WALLER, D.B. COSULICH, M.J. FAHREN-BACH, M.E. HOLTQUIST, E. KUH, E.H. NORTHEY, D.R. SEEGER, J.P. SICKELS & J.M. SMITH, Science 103, 667 (1946)
- [15] H.K. MITCHELL, E.E. SNELL & R.J. WILLIAMS, J. Amer. chem. Soc. 63, 2284 (1941)
- [16] H.E. SAUBERLICH & C.A. BAUMANN, J. biol. Chemistry 176, 165 (1948)

- [17] T.J. BOND, T.J. BARDOS, M. SIBLEY & W. SHIVE, J.
Amer. chem. Soc. 71, 3852 (1949)
- [18] J.C. KERESZTESY & M. SILVERMAN, J. Amer. chem.
Soc. 73, 5510 (1951)
- [19] H.E. Sauberlich, J. biol. Chemistry, 195, 337
(1952)
- [20] M. VISCONTINI & H.R. WEILENMANN, Helv. 41, 2170
(1958)
- [21] M. VISCONTINI & H.R. WEILENMANN, Helv. 42, 1854
(1959)
- [22] S. KAUFMAN, Biochim. Biophys. Acta 27, 428 (1958)
- [23] S. KAUFMAN, J. biol. Chem. 234, 2677 (1959)
- [24] I. SIEGEL & J. LAFAYE, Proc. Soc. Exptl. Biol.
Med. 74, 620 (1950)
- [25] C. MITOMA & D.M. GREENBERG, J. biol. Chemistry
196, 599 (1952)
- [26] R.L. BLAKLEY, Nature 173, 729 (1954)
- [27] R.L. KISLIUK & W.J. SAKAMI, J. Amer. chem. Soc.
76, 1456 (1954)
- [28] R.L. BLAKLEY, Biochem. J. 58, 448 (1954)
- [29] N. ALEXANDER & D.M. GREENBERG, J. biol. Chemistry
214, 821 (1955)
- [30] R.L. KISLIUK & W.J. SAKAMI, J. biol. Chemistry
214, 47 (1955)
- [31] E.L.R. STOKSTAD & J. KOCH, Physiol. Rev. 47, 83
(1967)
- [32] R.L. BLAKLEY, The Biochemistry of Folic Acid and
related Pteridines, Amsterdam &
London 1969
- [33] M. VISCONTINI, Fortschritt der chem. Forschung 9,
605 (1968)
- [34] M. VISCONTINI, Chemistry and Biology of Pteridines
(Proceedings of the Fourth Inter-

national Symposium on Pteridines)
Intern. Acad. Printing, Tokyo 1970,
p. 217

- [35] J.A. BLAIR & A.J. PEARSON, J. chem. Soc. Perkin II
1974, 80
- [36] R. WEBER & M. VISCONTINI, Helv. 58, 1772 (1975)
- [37] R. WEBER & M. VISCONTINI, Helv. 59, 2379 (1976);
J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 60,
1926 (1977)
- [38] J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 57, 1651 (1974);
ibid. 60, 447 (1977)
- [39] W. FRICK in Chemistry and Biology of Pteridines
(Pfleiderer, W., ed) pp. 695 - 703
(1975), Walter de Gruyter, Berlin
- [40] R. WEBER & M. VISCONTINI, Helv. 58, 1772 (1975)
- [41] E. KHALIFA, P.K. SENGUPTA, J.H. BIERI & M. VISCON-
TINI, Helv. 59, 242 (1976)
- [42] J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 56, 2905 (1973)
- [43] H.J. FURRER, J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 61,
2744 (1978)
- [44] W. FRICK, Dissertation, Universität Zürich 1975
- [45] S. FUTTERMANN, J. biol. Chemistry 228, 1031 (1957);
R.L. BLAKLEY, Nature 188, 231 (1960)
- [46] C.K. MATHEWS & F.M. HUENNEKENS, J. biol. Chemistry
238, 4005 (1962)
- [47] W. FRICK, R. WEBER & M. VISCONTINI, Helv. 57, 2658
(1974)
- [48] D.B. COSULICH & J.M. SMITH, Jr., J. Amer. chem.
Soc. 71, 3574 (1949)
- [49] E. KHALIFA, H.J. FURRER, J.H. BIERI & M. VISCONTINI,
Helv. 61, 2739 (1978)
- [50] M. POE & K. HOOGSTEN, J. biol. Chemistry 253, 543
(1978)

- [51] G. MUELLER & W. v. PHILIPSBORN, *Helv.* 56, 2680 (1973)
- [52] M. VISCONTINI & J.H. BIERI, *Helv.* 54, 2291 (1971)
- [53] J.H. BIERI, *Helv.* 60, 2303 (1977)
- [54] U. EWERS, H. GUENTHER & L. JAENICKE, *Chem. Ber.* 106, 3951 (1973); W. FRICK, "Chemistry and Biology of Pteridines", *Proc. of the 5th International Symposium*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1975, p. 695
- [55] E.L. PATTERSON, H.P. BROQUIST, A.M. ALBRECHT, M.H. v. SALTZA & E.L.R. STOKSTAD, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3167 (1955)
- [56] H.S. FORREST & H.K. MITCHELL, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 4865 (1955)
- [57] M. VISCONTINI, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, *Helv.* 38, 2034 (1955)
- [58] M. VISCONTINI, E. LOESER & P. KARRER, *Helv.* 41, 44 (1958)
- [59] H.S. FORREST & H.K. MITCHELL, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 5656 (1954)
- [60] H.S. FORREST & H.K. MITCHELL, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 5658 (1954)
- [61] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Ann. Chem.* 662, 72 (1963)
- [62] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BUEHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* 47, 1948 (1964)
- [63] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Chem. Ber.* 96, 1406 (1963)
- [64] T. FUKUSHIMA & T. SHIOTA, *J. biol. Chem.* 247, 4549 (1972)
- [65] S. KAUFMANN, *J. biol. Chem.* 226, 511 (1957)
- [66] S. KAUFMANN, *J. biol. Chem.* 230, 931 (1958)
- [67] S. KAUFMANN, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 50, 1085 (1963)

- [68] S. KAUFMANN, J. biol. Chem. 242, 3934 (1967)
- [69] M. NAGAI, Arch. Biochem. Biophys. 126, 426 (1968)
- [70] S. KATO, M. NAGAI, Y. NAGAI, T. FUKUSHIMA & M. AKINO, in K. Iwai: Chemistry and Biology of Pteridines, (Tokio 1970), Seite 225
- [71] M. VISCONTINI, in K. Iwai: Chemistry and Biology of Pteridines, (Tokio 1970) Seite 217
- [72] G. MATTERN, Hydroxylierung von aromatischen Aminosäuren mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Tetrahydropterin (Dissertation, Universität Zürich, 1969)
- [73] M. VISCONTINI, in "Fortschritte der chemischen Forschung", Band 9, Heft 4, Springer 1968
- [74] M. VISCONTINI, M. FRATER-SCHROEDER, M. COGOLIGREUTER & M. ARGENTINI, Helv. 53, 1434 (1970)
- [75] A.R. BRENNEMAN & S. KAUFMANN, Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 177 (1964)
- [76] L. ELLENBOGEN, R.J. TAYLOR & G.B. BRUNDAGE, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 708 (1965)
- [77] M. VISCONTINI & G. MATTERN, Helv. 53, 832 (1970)
- [78] D.G. GRAHAME-SMITH, J. Biochem. 105, 351 (1967)
- [79] W. LOVENBERG, E. JEQUIER & A. SJOERDSMA, Science 155, 217 (1967)
- [80] H.N. GUTTMAN, in Pfeleiderer: Pteridine Chemistry (Pergamon Press 1964), Seite 255
- [81] H.S. FORREST & S. NAWA, in Pfeleiderer: Pteridine Chemistry (Pergamon Press 1964), Seite 281
- [82] T. FAKUSHIMA, Arch. Biochem. Biophys. 139, 361 (1970)

- [83] H. REMBOLD & H. METZGER, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 194 (1967)
- [84] A. BOBST & M. VISCONTINI, Helv. 49, 875 (1966)
- [85] B. SCHIRCKS, J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 59, 248 (1976)
- [86] B. SCHIRCKS, J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 61, 2731 (1978)
- [87] B. SCHIRCKS, Dissertation, Universität Zürich, 1978
- [88] S.W. BAILEY & J.E. AYLING, J. biol. Chemistry 253, 1598 (1978)
- [89] G.A. JERVIS, J. biol. Chem. 169, 651 (1947)
- [90] S. UDENFRIEND & S.P. BESSMANN, J. biol. Chem. 203, 961 (1953)
- [91] S. KAUFMAN, Science 128, 1507 (1958)
- [92] J. SCHAUB, S. DAEUMLING, H-CH. CURTINS, A. NIEDERWIESER, K. BARTHOLOME, M. VISCONTINI, B. SCHIRCKS & J.H. BIERI, Archives of Disease in Childhood, 53, 674 (1978)
- [93] H.J. FURRER, J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 62, im Druck (1979)
- [94] M. VISCONTINI & R. PROVENZALE, Helv. 51, 1495 (1968)
- [95] M. VISCONTINI, R. PROVENZALE, S. OHLGART & J. MALLEVIALLE, Helv. 53, 1202 (1970)
- [96] A. NIEDERWIESER, H.-CH. CURTIUS, O. BETTONI, J.H. BIERI, B. SCHIRCKS, M. VISCONTINI & J. SCHAUB, Lancet, 1979, 131
- [97] B. SCHIRCKS, J.H. BIERI & M. VISCONTINI, Helv. 60, 211 (1977)

Curriculum Vitae

Am 16. September 1948 wurde ich, Hans-Jürg Furrer, in Zürich als Bürger von Zürich und Bünzen AG geboren. Ich besuchte in der Stadt Zürich die Primarschule sowie drei Jahre Sekundarschule. Anschliessend absolvierte ich 4 1/2 Jahre die Kantonale Handelsschule Freudenberg. Im Herbst 1969 schloss ich mit der Handelsmatur ab. Noch im gleichen Jahr begann ich mit dem Chemiestudium an der Universität Zürich. Die Grundausbildung beendete ich mit dem Diplom im Jahre 1976. Im Herbst 1976 fing ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Viscontini mit der Dissertation in org. Chemie an. Während meiner Studien besuchte ich Vorlesungen, Uebungen und Praktika bei den Herren Dozenten K. Bernauer, A. Dreiding, C.H. Eugster, H. Fischer, E. Hadorn, H.J. Hediger, M. Hesse, F. Laves, H. Labhart, W. Ludwig, V. Meyer, H. Oswald, W. von Philipsborn, H. Schmid, H. Staub, M. Viscontini, B. van der Waerden, G. Wagnière, F. Waldner und H. Werner. Seit Oktober 1976 bin ich als kantonaler Assistent angestellt. Meine Aufgabe ist die Leitung des Praktikums für Sekundarlehramtskandidaten sowie eine Vorlesungsassistentz.

